

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|---|---|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT/BRAND | WEITERES VORGEHEN | siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/01416 | Internationales Anmelde datum <i>(Tag/Monat/Jahr)</i> 02/05/2000 | (Frühestes) Prioritätsdatum <i>(Tag/Monat/Jahr)</i> 30/04/1999 |
| Anmelder BRAND, KARSTEN | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.
 - Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.
- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das
 - in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.
 - zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
 - bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
 - Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
 - Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

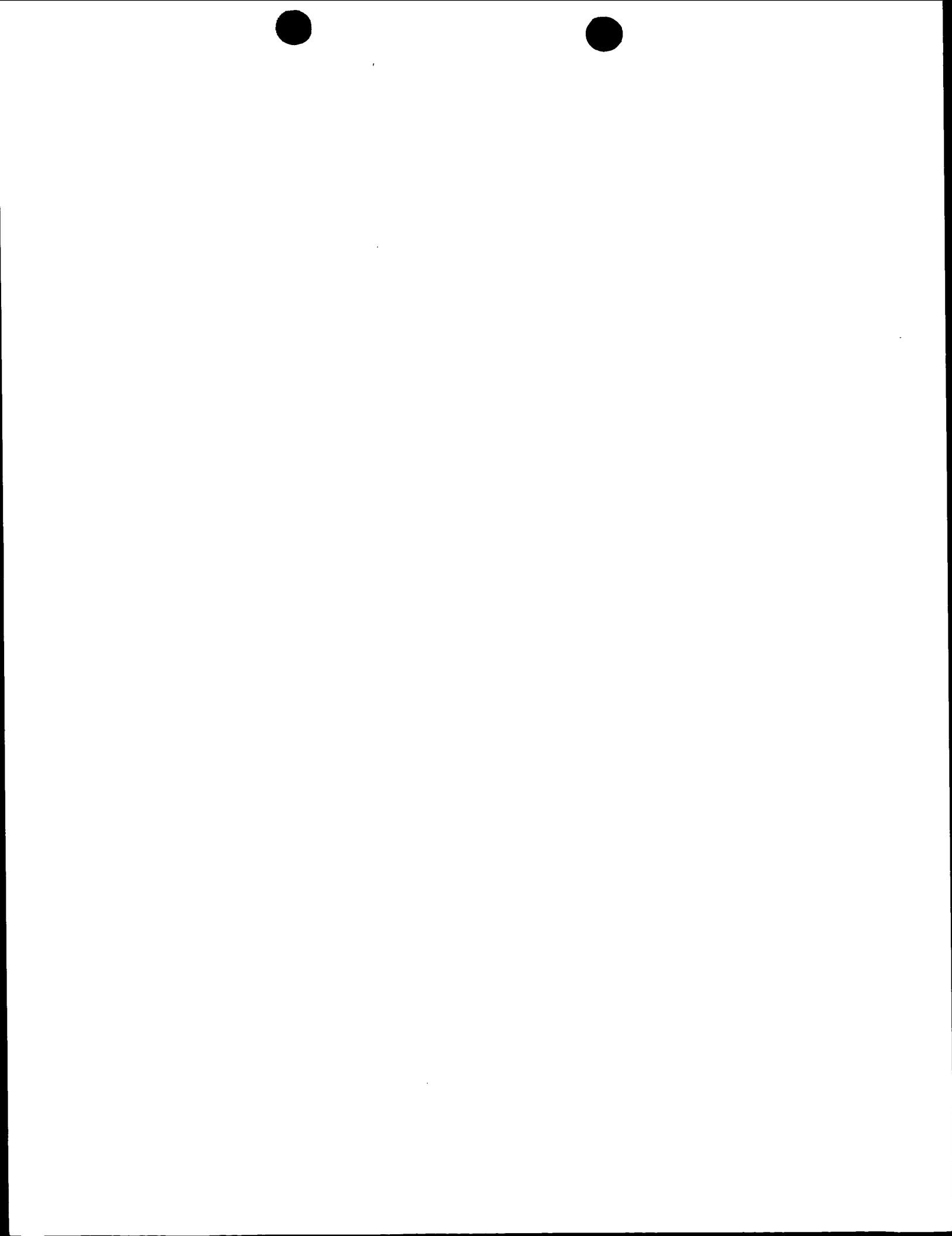
5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

- wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.
- wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

- wie vom Anmelder vorgeschlagen
- weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.
- weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

keine der Abb.



INTERNATIONALER PUBLISHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01416

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie ^a | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------------------|--|------------------------------|
| X ✓ | KAWAMATA H. ET AL: "Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1995) 63/5 (680-687). , XP000953304 das ganze Dokument ---- | 1-14, 32-37, 45, 47-51 |
| X | US 5 731 192 A (REEDERS STEPHEN T ET AL) 24. März 1998 (1998-03-24) das ganze Dokument ---- | 1, 15-17, 40, 46 |
| A ✓ | AHMAD A ET AL: "Mechanisms of metastasis." CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY-HEMATOLOGY, Bd. 26, Nr. 3, Dezember 1997 (1997-12), Seiten 163-173, XP000953342 ISSN: 1040-8428 das ganze Dokument ---- | 10-19, 32-48 |
| A ✓ | GOSSEN M ET AL: "TIGHT CONTROL OF GENE EXPRESSION IN MAMMALIAN CELLS BY TETRACYCLINE-RESPONSIVE PROMOTERS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 89, Nr. 12, 15. Juni 1992 (1992-06-15), Seiten 5547-5551, XP000564458 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument ---- | 7, 8 |
| A ✓ | XIAO W ET AL: "Adeno - associated virus as a vector for liver-directed gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, US, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, Bd. 72, Nr. 12, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 10222-10226, XP002125023 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument ---- | 47-51 |
| A ✓ | WO 97 04117 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; SANDIG VOLKER (DE); LOESER PETER (DE); ST) 6. Februar 1997 (1997-02-06) das ganze Dokument ----- | 47-51 |



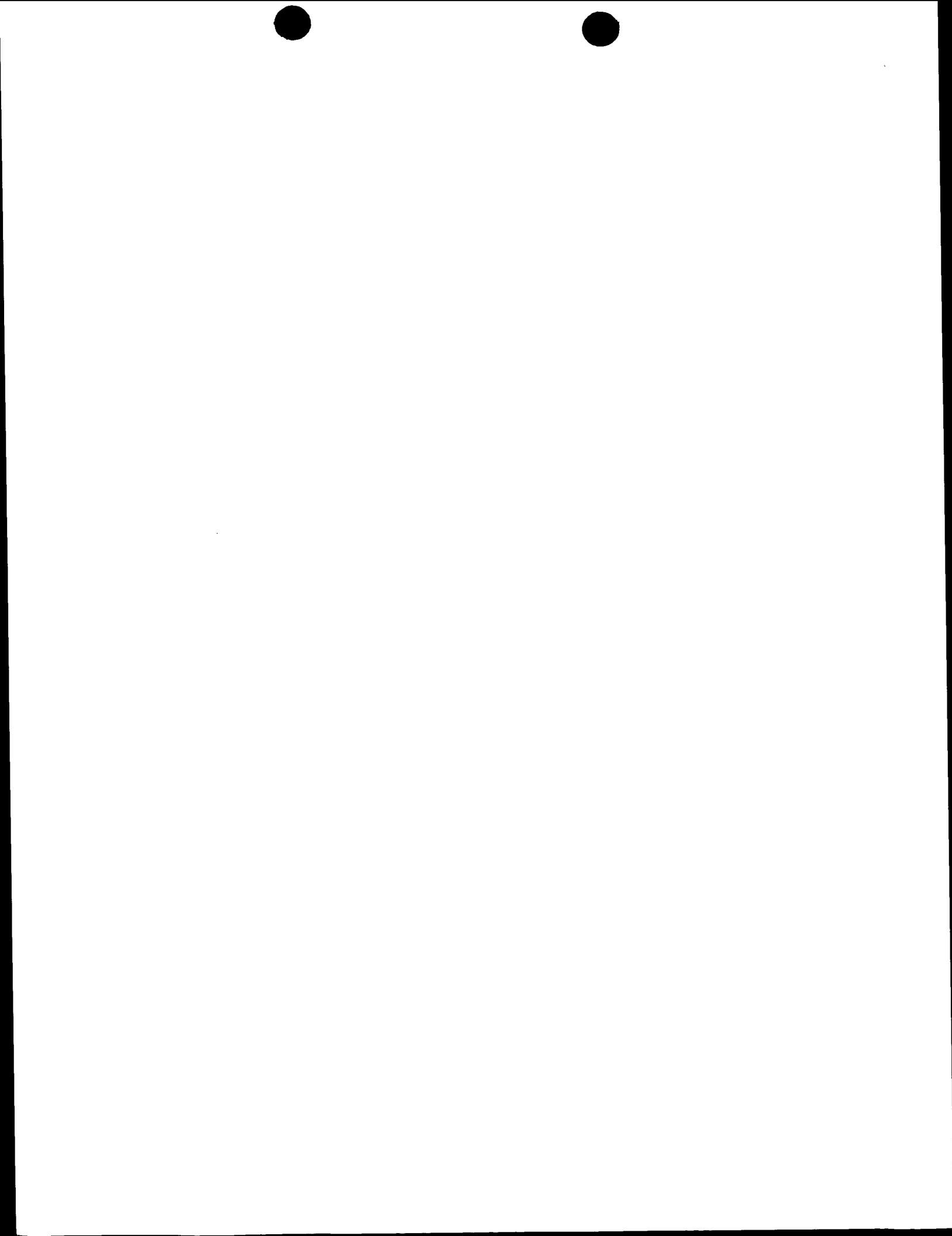
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01416

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|---|------------------|---|--|--|
| WO 9603515 | A | 08-02-1996 | AT 188256 T AU 693584 B AU 3119095 A AU 712383 B AU 3119195 A CA 2196051 A CA 2196052 A DE 69514234 D DE 69514234 T DK 774005 T EP 0774005 A EP 0772455 A EP 0919622 A ES 2143641 T WO 9603151 A GR 3032744 T JP 10503646 T JP 10505335 T NZ 290448 A NZ 290449 A PT 774005 T US 6004550 A US 6025340 A ZA 9506263 A ZA 9506264 A | | 15-01-2000 02-07-1998 22-02-1996 04-11-1999 22-02-1996 08-02-1996 08-02-1996 03-02-2000 13-07-2000 22-05-2000 21-05-1997 14-05-1997 02-06-1999 16-05-2000 08-02-1996 30-06-2000 07-04-1998 26-05-1998 26-01-1998 26-08-1998 30-06-2000 21-12-1999 15-02-2000 22-05-1996 15-03-1996 |
| US 5731192 | A | 24-03-1998 | NONE | | |
| WO 9704117 | A | 06-02-1997 | DE 19525900 C AT 189481 T CA 2226926 A DE 59604375 D EP 0839205 A ES 2146404 T JP 11509412 T US 6025195 A | | 12-12-1996 15-02-2000 06-02-1997 09-03-2000 06-05-1998 01-08-2000 24-08-1999 15-02-2000 |



INTERNATIONALER PESCHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01416

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|-----------------------------|
| X | BOEDEKER B ET AL: "Design of transmembrane suicide fusion genes for genetic manipulation of T-cells." BLOOD, Bd. 86, Nr. 10 SUPPL. 1, 1995, Seite 995A XP000953303 37th Annual Meeting of the American Society of Hematology; Seattle, Washington, USA; December 1-5, 1995 ISSN: 0006-4971 das ganze Dokument ---- | 1-9, 20-24 |
| X | BLEZINGER P ET AL: "Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene." NATURE BIOTECHNOLOGY, (1999 APR) 17 (4) 343-8., XP002151680 das ganze Dokument ---- | 1-9, 29, 30, 41-44 |
| X | DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 10. Februar 1999 (1999-02-10) SCHULTZ JAN ET AL: "Long-lasting anti-metastatic efficiency of interleukin 12-encoding plasmid DNA." Database accession no. PREV199900145697 XP002151681 Zusammenfassung & HUMAN GENE THERAPY, Bd. 10, Nr. 3, 10. Februar 1999 (1999-02-10), Seiten 407-417, ISSN: 1043-0342 ---- | 1-9, 29, 30, 41-44 |
| X | LI H ET AL: "Adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice." GENE THERAPY, Bd. 5, Nr. 8, August 1998 (1998-08), Seiten 1105-1113, XP000953414 ISSN: 0969-7128 das ganze Dokument ---- | 1-9, 25-28, 31, 41-44 |
| X | HUANG Y W ET AL: "Adhesion molecules as targets for cancer therapy." HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, (1997 APR) 12 (2) 467-77. REF: 119 , XP000953300 das ganze Dokument ---- | 1-9, 18, 19, 38, 39 |
| | | -/- |



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01416

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 7 A61K48/00 A61P35/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | <p>✓ MARAIS R. ET AL: "A cell surface tethered enzyme improves efficiency in gene-directed enzyme prodrug therapy" NATURE BIOTECHNOLOGY, (1997), 15/13 (1373-1377), 32 REFERENCE(S) CODEN: NABIFO ISSN: 1087-0156, XP002151679</p> <p>C.J. Springer, CRC Centre for Cancer Therapeutics, Institute of Cancer Research, Cotswold Rd., Sutton, Surrey SM2 5NG, United Kingdom. E-mail: caroline@icr.ac.uk das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-9, 20-24 |
| X | <p>✓ WO 96 03515 A (SPRINGER CAROLINE JOY ;MARAIS RICHARD (GB); CANCER RES CAMPAIGN TE) 8. Februar 1996 (1996-02-08) das ganze Dokument</p> <p>---</p> <p>-/-</p> | 1-9, 20-24 |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

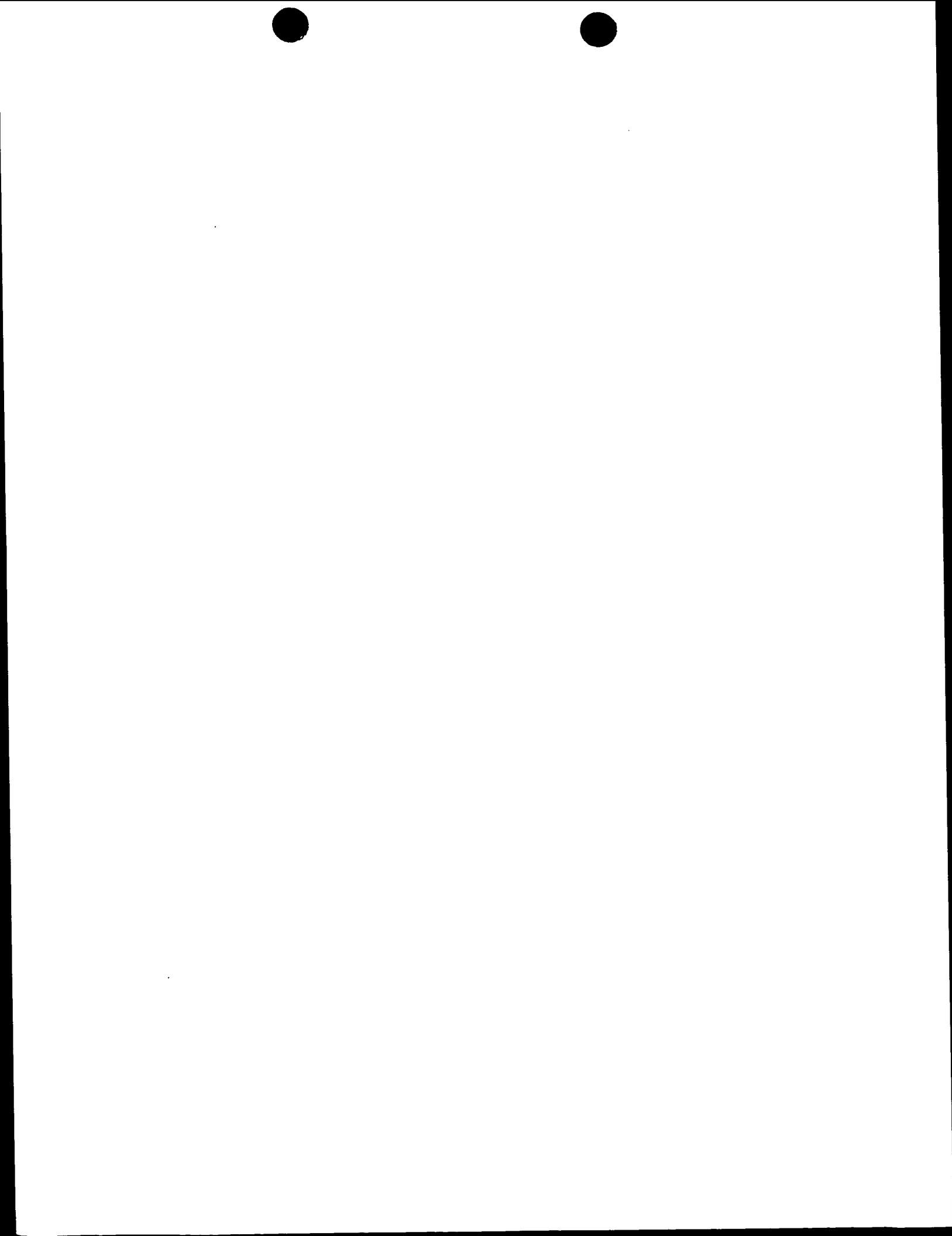
T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

| | |
|---|---|
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts |
| 9. November 2000 | 28/11/2000 |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Niemann, F |



15

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM
GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

REC'D 31 JUL 2001

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

| | | |
|---|--|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts PCT/Brand | WEITERES VORGEHEN | siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts (Formblatt PCT/IPEA/416) |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01416 | Internationales Anmeldedatum (<i>Tag/Monat/Jahr</i>) 02/05/2000 | Prioritätsdatum (<i>Tag/Monat/Tag</i>) 30/04/1999 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK A61K48/00 | | |
| Anmelder BRAND, Karsten et al. | | |
| <p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 10 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 2 Blätter.</p> <p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts II <input type="checkbox"/> Priorität III <input type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit IV <input checked="" type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderlichen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</p> | | |

| | |
|--|---|
| Datum der Einreichung des Antrags 29/11/2000 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 27.07.2001 |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde: Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter Lanzrein, M Tel. Nr. +49 89 2399 7358 |





INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01416

I. Grundlage des Berichts

1. Hinsichtlich der **Bestandteile** der internationalen Anmeldung (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten (Regeln 70.16 und 70.17)*):
Beschreibung, Seiten:

1-14 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

6-51 ursprüngliche Fassung

1-5 eingegangen am 12/04/2001 mit Schreiben vom 27/03/2001

Zeichnungen, Blätter:

1/2,2/2 ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen der Behörde in der Sprache: zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01416

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:
- Ansprüche, Nr.:
- Zeichnungen, Blatt:

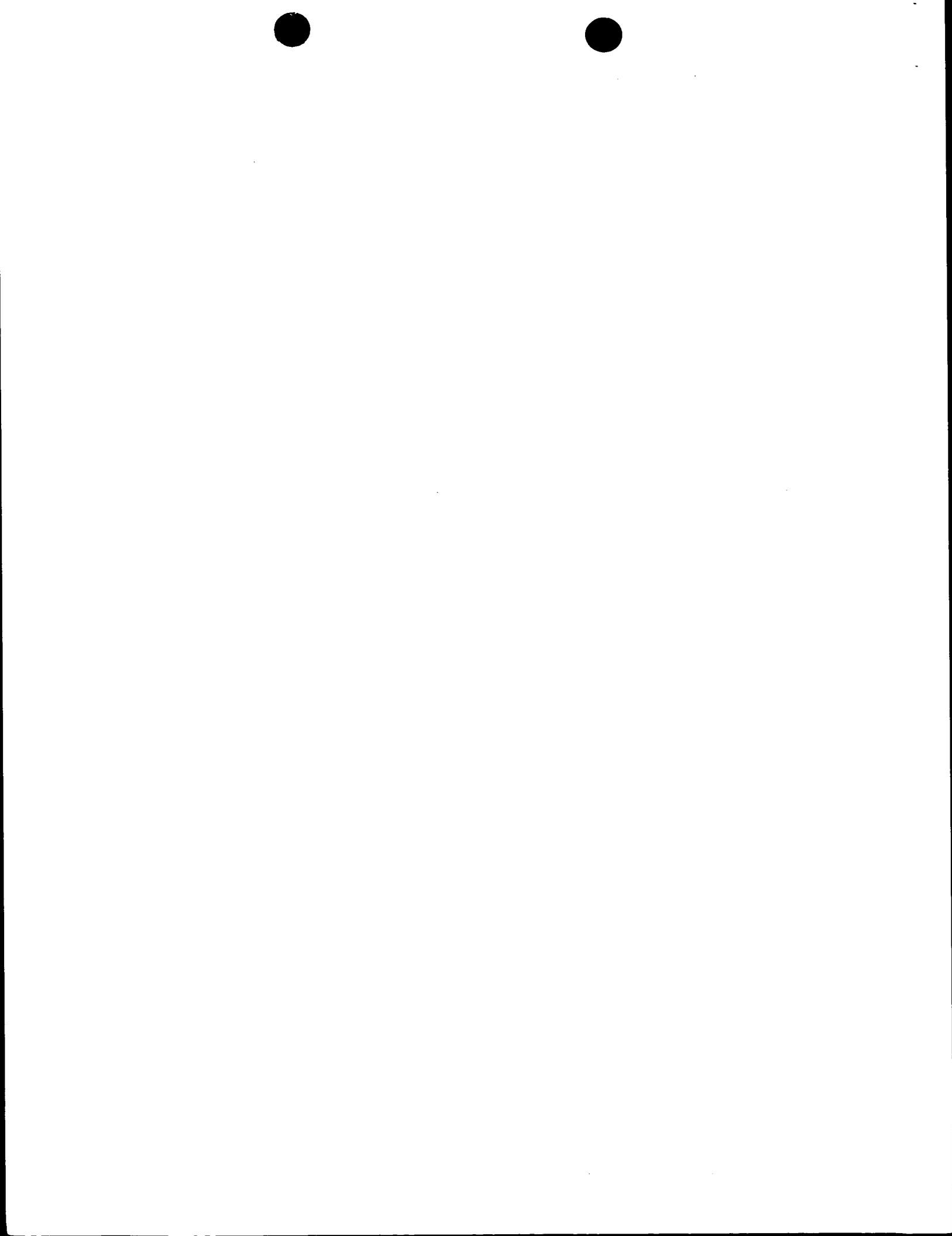
5. Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).
siehe Beiblatt*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

IV. Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

1. Auf die Aufforderung zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren hat der Anmelder:
 - die Ansprüche eingeschränkt.
 - zusätzliche Gebühren entrichtet.
 - zusätzliche Gebühren unter Widerspruch entrichtet.
 - weder die Ansprüche eingeschränkt noch zusätzliche Gebühren entrichtet.
2. Die Behörde hat festgestellt, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nicht erfüllt ist, und hat gemäß Regel 68.1 beschlossen, den Anmelder nicht zur Einschränkung der Ansprüche oder zur Zahlung zusätzlicher Gebühren aufzufordern.
3. Die Behörde ist der Auffassung, daß das Erfordernis der Einheitlichkeit der Erfindung nach den Regeln 13.1, 13.2 und 13.3
 - erfüllt ist
 - aus folgenden Gründen nicht erfüllt ist:
4. Daher wurde zur Erstellung dieses Berichts eine internationale vorläufige Prüfung für folgende Teile der internationalen Anmeldung durchgeführt:
 - alle Teile.
 - die Teile, die sich auf die Ansprüche Nr. beziehen.



**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER
PRÜFUNGSBERICHT**

Internationales Aktenzeichen PCT/DE00/01416

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

| | | | |
|------------------------------|-------|-----------|---------------------------------|
| Neuheit (N) | Ja: | Ansprüche | 7, 8, 13, 14, 17, 27-40 |
| | Nein: | Ansprüche | 1-6, 9-12, 15, 16, 18-26, 41-44 |
| Erfinderische Tätigkeit (ET) | Ja: | Ansprüche | |
| | Nein: | Ansprüche | 1-51 |

Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) Ja: Ansprüche 1-51
 Nein: Ansprüche

2. Unterlagen und Erklärungen
siehe Beiblatt

VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:
siehe Beiblatt



Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1: LI H ET AL: 'Adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice.' GENE THERAPY, Bd. 5, Nr. 8, August 1998 (1998-08), Seiten 1105-1113.
- D2: KAWAMATA H. ET AL: 'Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma.' INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1995) 63/5 (680-687)..
- D3: US-A-5 731 192 (REEDERS STEPHEN T ET AL) 24. März 1998 (1998-03-24)
- D4: HUANG Y W ET AL: 'Adhesion molecules as targets for cancer therapy.' HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, (1997 APR) 12 (2) 467-77. REF: 119.
- D5: MARAIS R. ET AL: 'A cell surface tethered enzyme improves efficiency in gene-directed enzyme prodrug therapy' NATURE BIOTECHNOLOGY, (1997), 15/13 (1373-1377), 32 REFERENCE(S) CODEN: NABIF0 ISSN: 1087-0156.
- D6: BOEDEKER B ET AL: 'Design of transmembrane suicide fusion genes for genetic manipulation of T-cells.' BLOOD, Bd. 86, Nr. 10 SUPPL. 1, 1995, Seite 995A.
- D7: BLEZINGER P ET AL: 'Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene.' NATURE BIOTECHNOLOGY, (1999 APR) 17 (4) 343-8.
- D8: DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 10. Februar 1999 (1999-02-10) SCHULTZ JAN ET AL: 'Long-lasting anti-metastatic efficiency of interleukin 12-encoding plasmid DNA.' Database accession no. PREV199900145697 & HUMAN GENE THERAPY, Bd. 10, Nr. 3, 10. Februar 1999 (1999-02-10), Seiten 407-417, ISSN: 1043-0342



Zu Punkt I

Grundlage des Berichts

Die mit Schreiben vom 27. 03. 2001 eingereichten Änderungen bringen Sachverhalte ein, die im Widerspruch zu Artikel 34 (2) b) PCT über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgehen.

Im Verfahren der Ansprüche 1-5 wurde die gentherapeutische "Imprägnierung von Normalgewebe" abgeändert zu "Imprägnierung des das Tumorgewebe umgebenden Normalgewebes". Für dieses neu eingeführte Merkmal konnte in den ursprünglichen Dokumenten der Anmeldung keine Basis gefunden werden. Der Gegenstand des mit dem obengenannten Schreiben eingereichten Anspruchssatzes geht deshalb über den ursprünglichen Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung hinaus und wird deshalb infolge von Artikel 34 (2) b) PCT abgelehnt. Dieser Internationale Vorläufige Prüfungsbericht wurde deshalb auf der Grundlage des bei der Anmeldung eingereichten Anspruchssatzes erstellt.

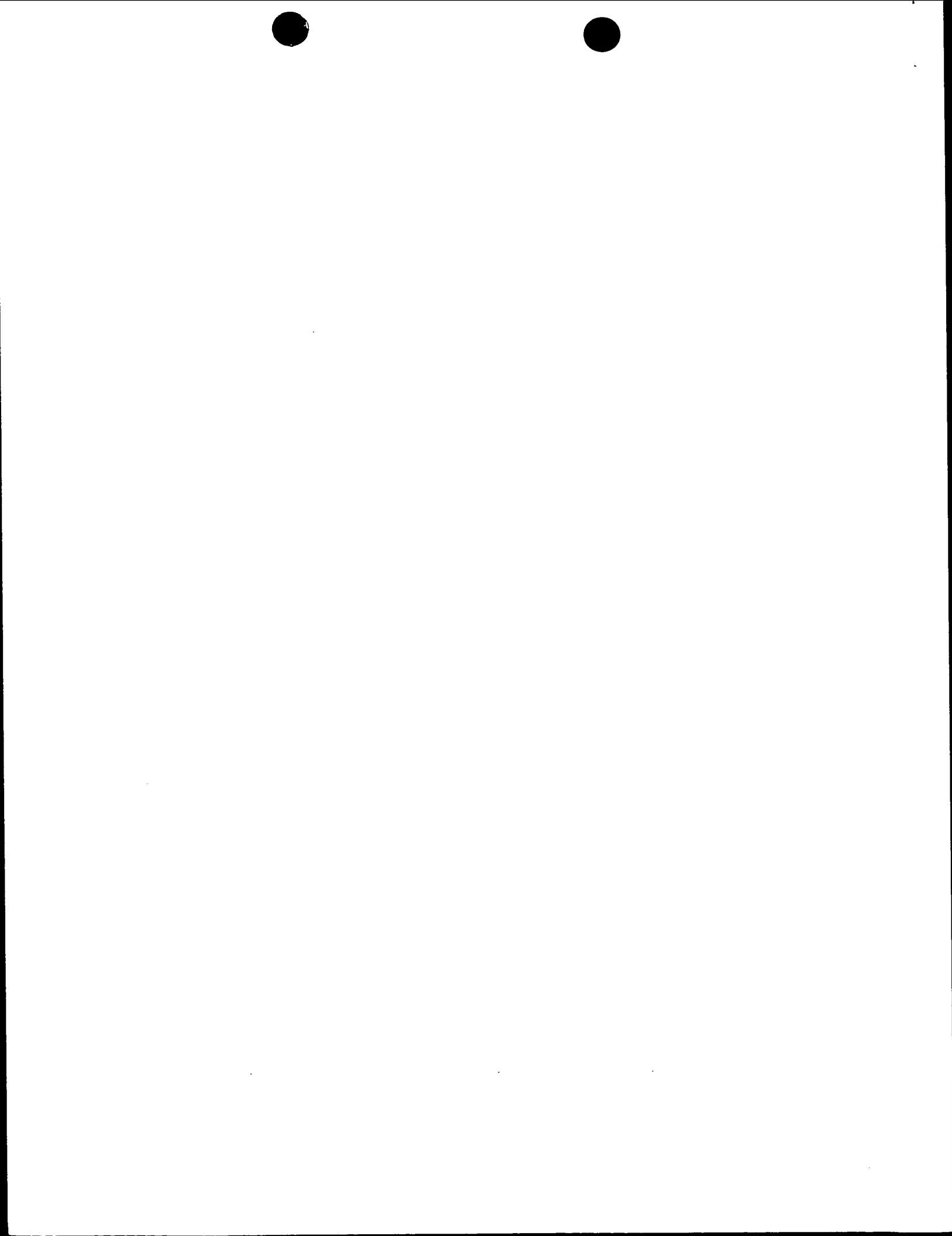
Zu Punkt IV

Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung

Die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde ist der Ansicht, dass die vorliegende Anmeldung die Erfordernisse bezüglich der Einheitlichkeit der Erfindung im Sinne von Art. 34(3) PCT und Regel 13.1 PCT nicht erfüllt.

Infolge der Regel 13.1 PCT darf sich die Internationale Anmeldung "nur auf eine Erfindung oder eine Gruppe von Erfindungen beziehen, die so zusammenhängen, dass sie eine einzige allgemeine erfinderische Idee verwirklichen". Dabei sollte ein technischer Zusammenhang im Sinne der Regel 13.2 PCT bestehen, der in einem oder mehreren gleichen oder entsprechenden besonderen technischen Merkmal/en zum Ausdruck kommt. Die Erfinderische Idee bzw. die besonderen technischen Merkmale müssen gegenüber dem Stand der Technik neu und nicht nahegelegt sein.

Das vereinheitlichende Konzept der verschiedenen Vektoren und Verfahren der vorliegenden Anmeldung ist die Anwendung auf nicht-Tumorgewebe zur Verhinderung der Metastasenbildung. Dieses Konzept wurde jedoch schon in D1 offenbart. D1



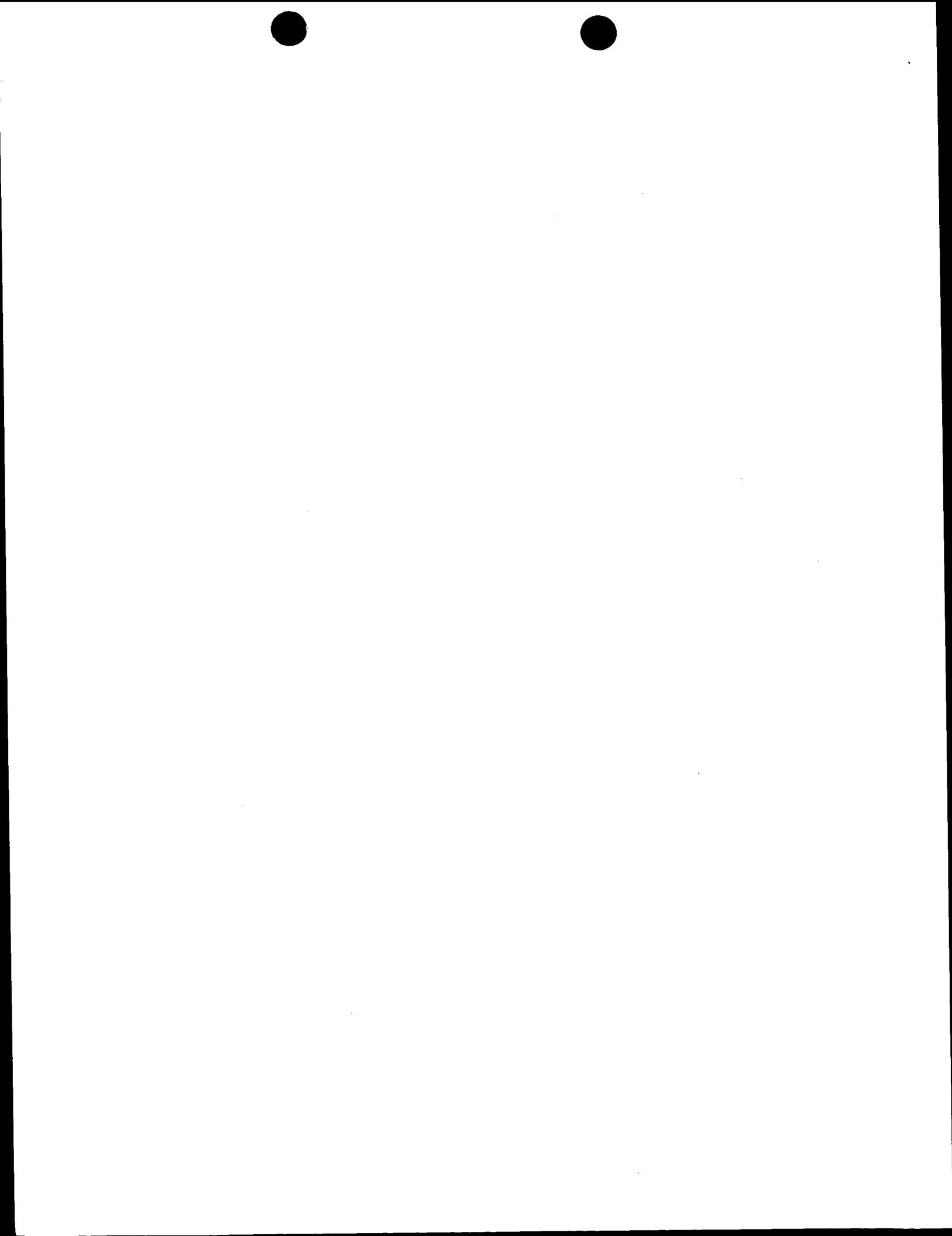
beschreibt einen adenoviralen Vektor, welcher ATF, ein N-terminales Fragment der Urokinase, unter Kontrolle des CMV Promotors exprimiert. Die systemische Verabreichung des Vektors an Mäuse verhinderte die Bildung von Metastasen in der Leber (S. 1108, rechte Kolonne, 2. Abschnitt; Fig. 7). Das besagte Konzept wurde ausserdem auch in D7 und D8 offenbart.

Da das vereinheitlichende Konzept gegenüber dem Stand der Technik nicht neu ist und auch keine weiteren besonderen technischen Merkmale im Sinne von Regel 13.2 erkannt werden können, ist das Erfordernis der Einheitlichkeit nicht erfüllt. Deshalb ist in der vorliegenden Anmeldung jeder Vektor bzw. jedes Verfahren mit einem bestimmten Vektor als separate Erfindung anzusehen.

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

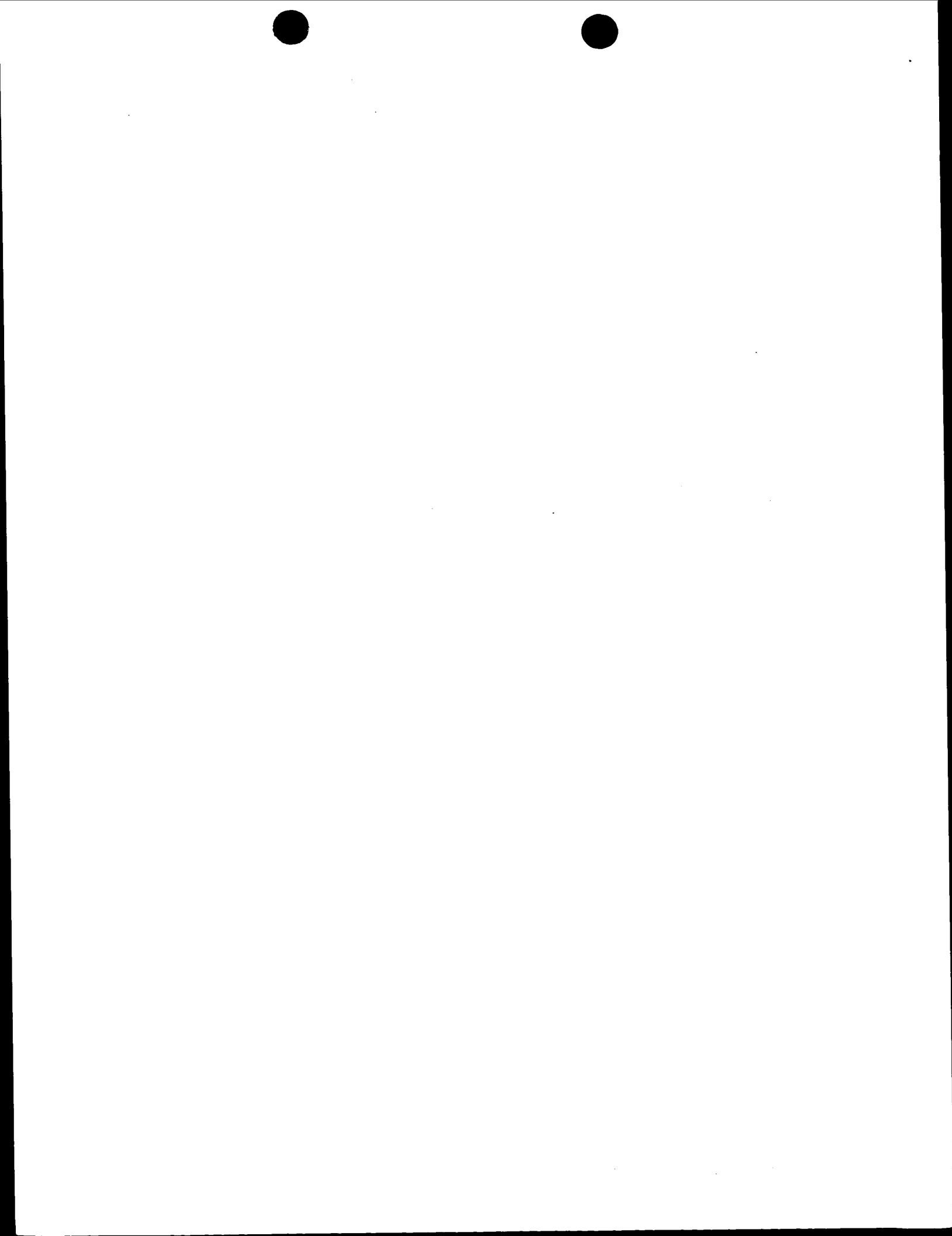
1. Die vorliegende Anmeldung betrifft Mittel und Verfahren zur gentherapeutischen Behandlung und Prophylaxe von Tumorerkrankungen. Gentransfervektoren werden dabei ans nicht-Tumorgewebe (Normalgewebe) verabreicht. Die Vektoren enthalten Gene, welche die Tumor- und insbesondere Metastasenbildung verhindern.
Im Ausführungsbeispiel wurde ein TIMP-2 exprimierendes Adenovirus bei Mäusen intravenös appliziert. Das Adenovirus verhinderte die Bildung von Metastasen in der Leber.
2. Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33(2) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-6, 9-12, 15, 16, 18-26, 41-44 nicht neu ist.
 - 2.1 Die Formulierung des Produktanspruchs 1 ergibt einen sehr breiten Schutzbereich. Das Merkmal "auf die Imprägnierung von Normalgewebe ausgerichtet" ist unklar (siehe unter VIII). Es wird für die folgende Analyse im



Sinne der Beschreibung (S. 3, erster Abschnitt) so verstanden, als ob damit die Transduktion von nicht-Tumorgewebe gemeint ist. In diesem Sinne werden durch das besagte Merkmal nur diejenigen Vektoren ausgeschlossen, welche spezifisch sind für Tumorgewebe. Tatsächlich sind ja die meisten gebräuchlichen Promotoren, Vektoren oder Gene aber ubiquitär "ausgerichtet" und das genannte Merkmal ist darum de facto nicht limitierend gegenüber dem Stand der Technik und der Schutzbereich ist sehr breit. Der Anspruch 1 sowie davon abhängige Ansprüche umfassen deshalb praktisch alle Vektoren, welche ein Gen zur Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen enthalten.

Analog gilt dies auch für abhängige Ansprüche, welche ein bestimmtes Gen spezifizieren. Aus diesem Grund sind die Ansprüche 10-12 gegenüber D2, die Ansprüche 15-16 gegenüber D3, die Ansprüche 18-19 gegenüber D4, die Ansprüche 20-22 gegenüber D5 sowie Ansprüche 23-24 gegenüber D6 nicht neu. Die genannten Dokumente offenbaren Vektoren enthaltend das für die entsprechenden Ansprüchen relevante Gen.

- 2.2 D1 beschreibt einen adenoviralen Vektor, welcher ATF, ein N-terminales Fragment der Urokinase, unter Kontrolle des CMV Promotors exprimiert. Die systemische Verabreichung des Vektors an Mäuse verhinderte die Bildung von Metastasen in der Leber (S. 1108, rechte Kolonne, 2. Abschnitt; Fig. 7). D1 ist deshalb neuheitsschädlich für die Ansprüche 1-6, 9, 25, 26, 41-44
3. Die vorliegende Anmeldung erfüllt nicht die Erfordernisse des Artikels 33 (3) PCT, weil der Gegenstand der Ansprüche 1-51 nicht auf einer erforderlichen Tätigkeit beruht.
- 3.1 Die Ansprüche 1-51 betreffen eine grosse Anzahl verschiedener Vektorsysteme mit welchen verschiedene tumorsuppressive Gene exprimiert werden sollen. Alle in den Ansprüchen genannten Vektorsysteme sowie Promotoren sind aus der Literatur bekannt und gehören zum Standardrepertoire der Molekularbiologen. Auch die Gene sowie ihre Anti-Tumorwirkung sind bekannt. Ausserdem ist z. B. aus D1 bekannt, dass mit Gentherapievektoren Tumoren behandelt werden können.
Der Beitrag der vorliegenden Anmeldung besteht deshalb lediglich aus dem



Zitieren von verschiedenen bekannten Vektoren mit bekannten Genen. Darin kann keine erfinderische Tätigkeit im Sinne von Art. 33 (3) PCT gesehen werden. Falls jedoch trotz allem davon ausgegangen würde, dass einzelne Vektorensysteme der vorliegenden Anmeldung erfinderisch wären, so wären sie nicht genügend durch die Beschreibung gestützt im Sinne von Art. 5/6 PCT. Mit Ausnahme von AdTIMP-2 sind die Vektoren nur sehr generell, d.h. nicht über den Stand der Technik hinausgehend, beschrieben. Der Fachmann kann deshalb aus der Beschreibung nichts entnehmen, was nicht schon aus dem Stand der Technik bekannt war. Falls aber ein über den Stand der Technik hinausgehender erfinderischer Beitrag bestehen würde, müsste dies durch die Beschreibung für den Fachmann nachvollziebar sein (Art. 5 PCT).
Der einzige Vektor, der im Detail beschrieben wird ist der TIMP-2 exprimierende Adenovirus. Für diesen Virus wird auch der gewünschte technische Effekt im Experiment gezeigt. Deshalb könnte also der AdTIMP-2 als durch die Beschreibung gestützt angesehen werden.

- 3.2 Die oben genannten Probleme mit erfinderischer Tätigkeit und Neuheit stammen von der Formulierung der Ansprüche, welche den Schutzmfang zu breit werden lässt.

Im Folgenden soll analysiert werden, ob eine Beschränkung auf das spezifische, experimentell bestätigte Ausführungsbeispiel die erfinderische Tätigkeit herstellen könnte.

Die spezifische Anwendung betrifft das Verfahren der systemischen Anwendung des TIMP-2 exprimierenden Adenovirus. Es wurde gezeigt, dass dadurch Lebermetastasen in Mäusen verhindert werden können.

Vom Dokument D1, das als nächstliegender Stand der Technik angesehen wird, unterscheidet sich der vorliegende Gegenstand, daß TIMP-2 anstelle von ATF als Transgen verwendet wird.

Die zu lösende Aufgabe bestand demnach darin, ein alternatives Verfahren zur Therapie und Prophylaxe von Tumorerkrankungen mittels systemisch angewandter Virus-Vektoren bereitzustellen.

Aus D2 (S. 683-684, Table 2) ist bekannt, dass TIMP-2 anti-tumorigene und insbesondere anti-metastatische Wirkung in der Lunge hat. Auch in D6 (S. 166, linke Kolonne, Linien 10-15) wird erwähnt, dass rekombinantes TIMP-2 die Metastasierung in der Lunge hemmt.

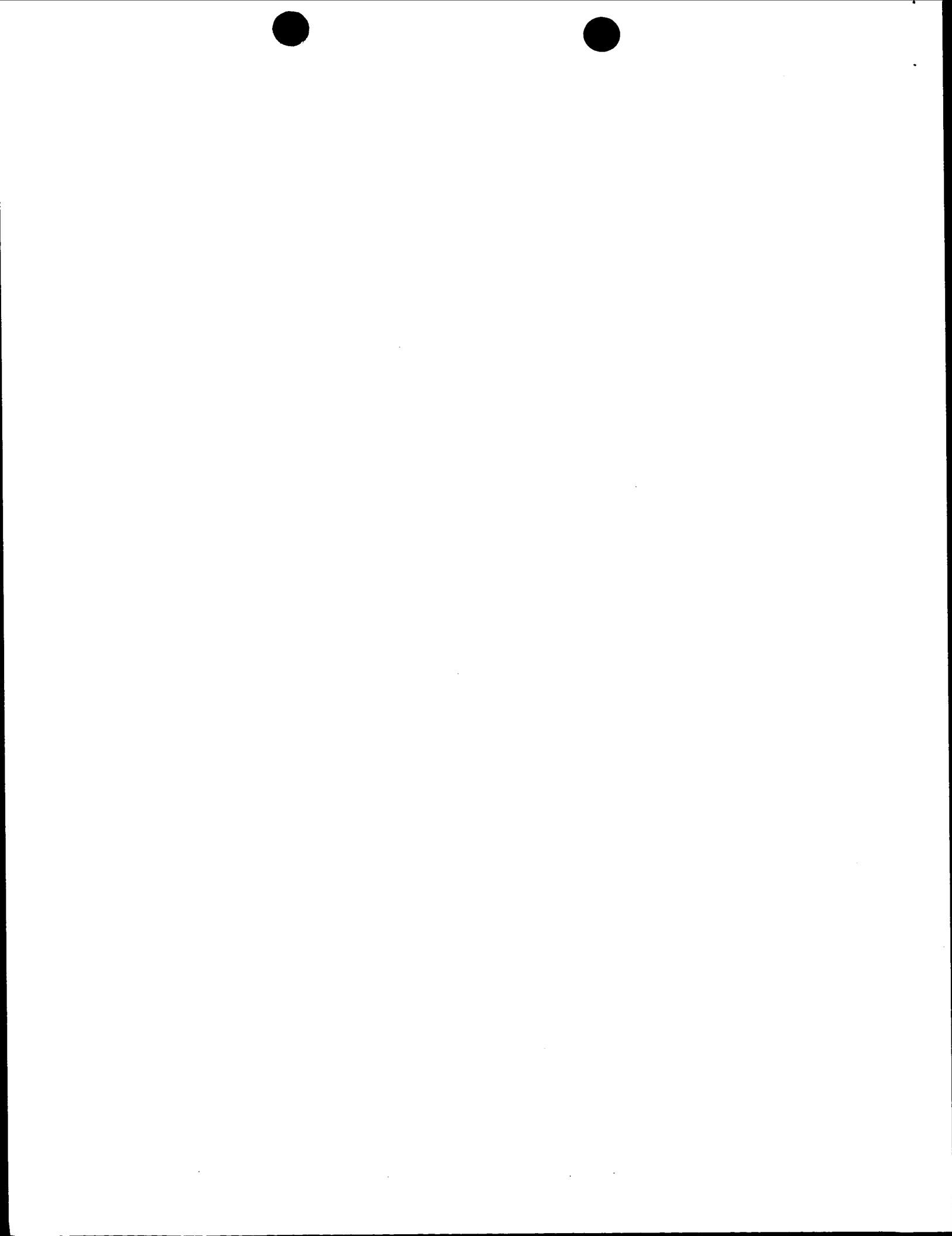


Es kann nicht als erforderlich angesehen werden, in dem besagten Verfahren anstelle von ATF ein anderes für seine metastasehemmende Wirkung bekanntes Gen zu verwenden. Damit reduziert sich der Beitrag nur auf die Auswahl eines anderen Gens unter vielen möglichen Genen (wie z.B. Urokinase oder die anderen in der Anmeldung erwähnten Gene). Da nicht ersichtlich ist, welche besonderen und unerwarteten Eigenschaften TIMP-2 gegenüber den besagten anderen Genen hat, scheint die Auswahl nur zufällig zu sein und nicht auf erforderlicher Tätigkeit im Sinne von Art. 33 (3) zu beruhen.

Zu Punkt VIII

Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

1. Der Begriff "Imprägnierung von Normalgewebe" ist nicht generell anerkannt im betreffenden Fachgebiet und deshalb unklar im Sinne von Art. 6 und Regel 10.1e PCT (cf PCT Guidelines, Section IV, II-4.15).
2. Die Ansprüche 1, 2, 13, 17, 31 entsprechen nicht den Erfordernissen des Artikels 6 PCT, weil der Gegenstand des Schutzbegehrens nicht klar definiert ist. In den Ansprüchen wird versucht, den Gegenstand durch das zu erreichende Ergebnis zu definieren; damit wird aber lediglich die zu lösende Aufgabe angegeben.
3. Für die Beurteilung der Frage, ob die Gegenstände der vorliegenden Ansprüche 2-4, 21, 22 gewerblich anwendbar sind, gibt es in den PCT-Vertragsstaaten keine einheitlichen Kriterien. Die Patentierbarkeit kann auch von der Formulierung der Ansprüche abhängen. Das EPA beispielsweise erkennt den Gegenstand von Ansprüchen, die auf die medizinische Anwendung einer Verbindung gerichtet sind, nicht als gewerblich anwendbar an; es können jedoch Ansprüche zugelassen werden, die auf eine bekannte Verbindung zur erstmaligen medizinischen Anwendung und die Verwendung einer solchen Verbindung zur Herstellung eines Arzneimittels für eine neue medizinische Anwendung gerichtet sind.



Patentansprüche

1. Mittel zur gentherapeutischen Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen umfassend einen

- Vektor im Sinne eines Gentransfervehikels
- Enhancer/Promotor
- Transgen

wobei mindestens einer der aufgeführten Bestandteile auf die Imprägnierung des das Tumorgewebe umgebenden Normalgewebes ausgerichtet ist.

2. Anwendung des Mittels nach Anspruch 1 zur gentherapeutischen Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen umfassend einen

- Vektor im Sinne eines Gentransfervehikels
- Enhancer/Promotor
- Transgen

wobei mindestens einer der aufgeführten Bestandteile auf die Imprägnierung des das Tumorgewebe umgebenden Normalgewebes ausgerichtet ist.

3. Anwendung eines Gentransfervektors umfassend ein Transgen in operativer Verknüpfung mit einem Enhancer/Promotor zur Herstellung eines Mittels für die gentherapeutische Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen durch Verabreichung an das das Tumorgewebe umgebende Normalgewebe.

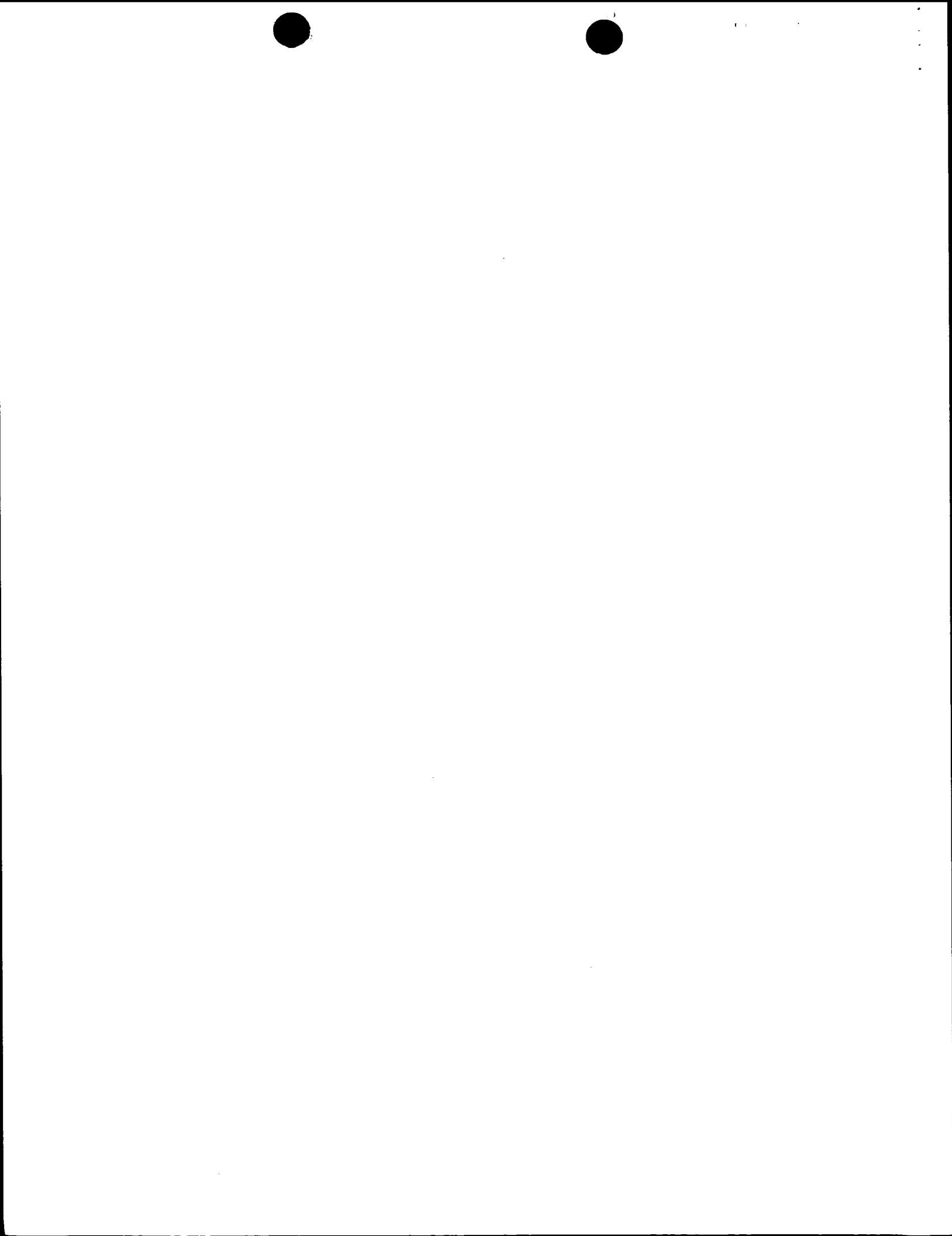
4. Verfahren zur gentherapeutischen Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel umfassend einen

- Vektor im Sinne eines Gentransfervehikels
- Enhancer/Promotor
- Transgen

wobei mindestens einer der aufgeführten Bestandteile auf die Imprägnierung von Normalgewebe ausgerichtet ist, einem Subjekt, welches einer prophylaktischen oder therapeutischen Tumorbehandlung bedarf, derart verabreicht, daß der Vektor im Wesentlichen von das Tumorgewebe umgebenden Normalzellen aufgenommen wird.



5. Mittel nach Anspruch 1, mit einem Promotor und/oder Enhancer, der durch Transkriptionsfaktoren reguliert wird, die im das Tumorgewebe umgebenden Normalgewebe aktiv sind.
6. Mittel nach Anspruch 5 enthaltend den CMV-Promotor oder den SV 40 Promotor oder den RSV Promotor, oder leberspezifische Promotoren, wie den Albumin Promotor oder lungenspezifische Promotoren oder hirngewebsspezifische Promotoren oder knochenspezifische Promotoren oder Promotoren, die in potentiellen metastatischen Zielorganen oder Organen des Entstehens von Primärtumoren aktiv sind.
7. Mittel nach Anspruch 5 enthaltend einen Enhancer/Promotor der durch Zugabe einer applizierbaren Substanz aktiviert wird.
8. Mittel nach Anspruch 5 und 7 bei dem es sich um einen Tetracyclin abhängigen oder einen Steroidhormon abhängigen Promotor handelt.
9. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend Transgene für Substanzen,
 - welche das Wachstum des Tumors begrenzen
 - den Tumor zerstören
 - das Normalgewebe vor Tumorinvasion schützen.
10. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend Gene von Metalloproteaseinhibitoren
11. Mittel nach Anspruch 1 und 10 enthaltend ein antitumorales Transgen kodierend für: TIMP-1 oder TIMP-2
12. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Protease-inhibitorisches Transgen kodierend für: TIMP-3 oder TIMP-4 oder PAI-1 oder PAI-2.
13. Mittel nach Anspruch 11 oder 12 enthaltend ein modifiziertes Transgen, dessen antitumorale Wirkung durch diese Modifikation verstärkt wurde.



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--|--|--|
| Applicant's or agent's file reference PCT/Brand | FOR FURTHER ACTION | SeeNotificationofTransmittalofInternational Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) |
| International application No. PCT/DE00/01416 | International filing date (day/month/year) 02 May 2000 (02.05.00) | Priority date (day/month/year) 30 April 1999 (30.04.99) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 48/00 | | |
| Applicant BRAND, Karsten | | |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 10 sheets, including this cover sheet.

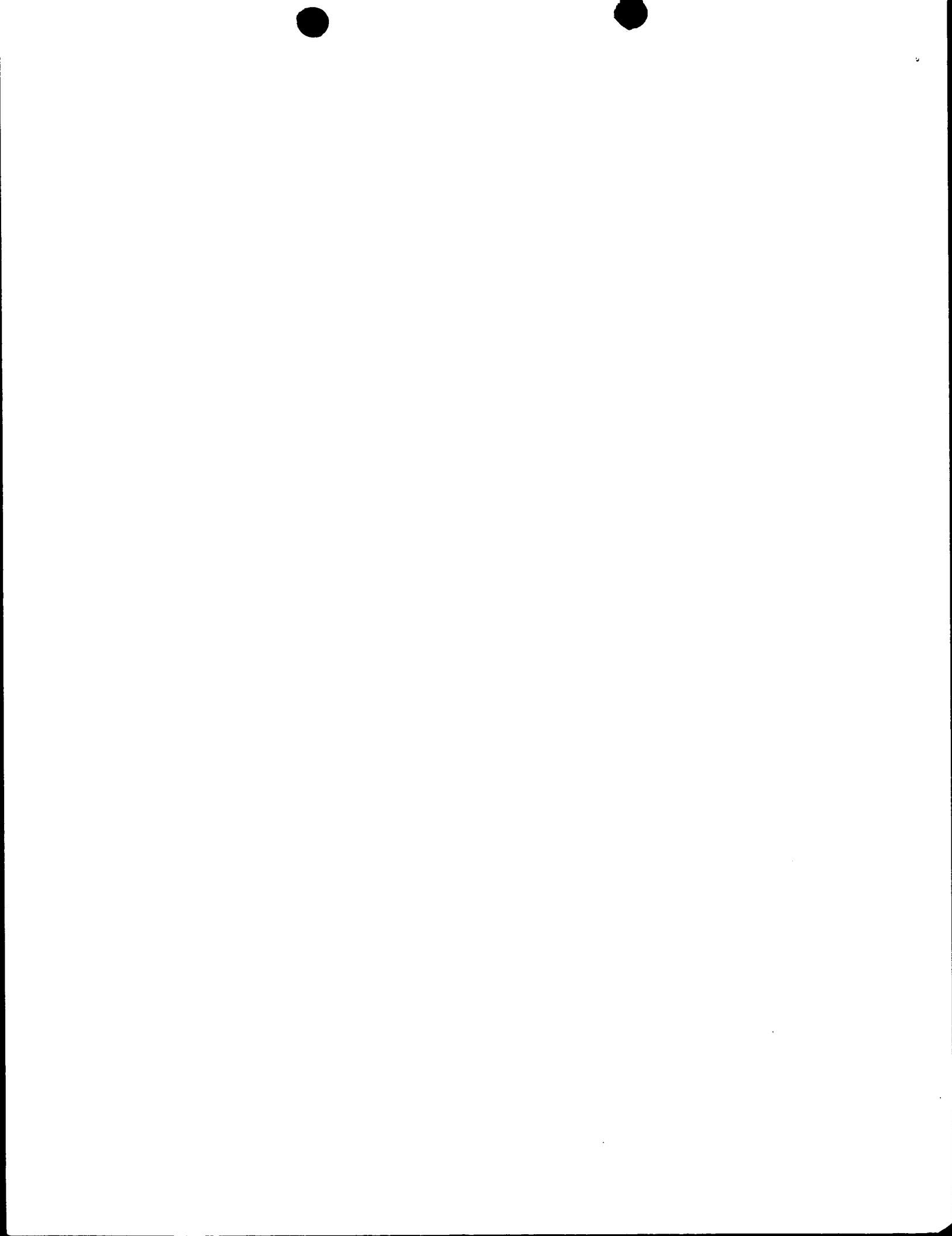
This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 2 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I Basis of the report
- II Priority
- III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV Lack of unity of invention
- V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI Certain documents cited
- VII Certain defects in the international application
- VIII Certain observations on the international application

| | |
|---|--|
| Date of submission of the demand 29 November 2000 (29.11.00) | Date of completion of this report 27 July 2001 (27.07.2001) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone N°. |



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/01416

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

 the international application as originally filed the description:

pages _____ 1-14 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the claims:

pages _____ 6-51 _____, as originally filed

pages _____, as amended (together with any statement under Article 19)

pages _____, filed with the demand

pages _____ 1-5 _____, filed with the letter of 12 April 2001 (12.04.2001)

 the drawings:

pages _____ 1/2,2/2 _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

 the sequence listing part of the description:

pages _____, as originally filed

pages _____, filed with the demand

pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

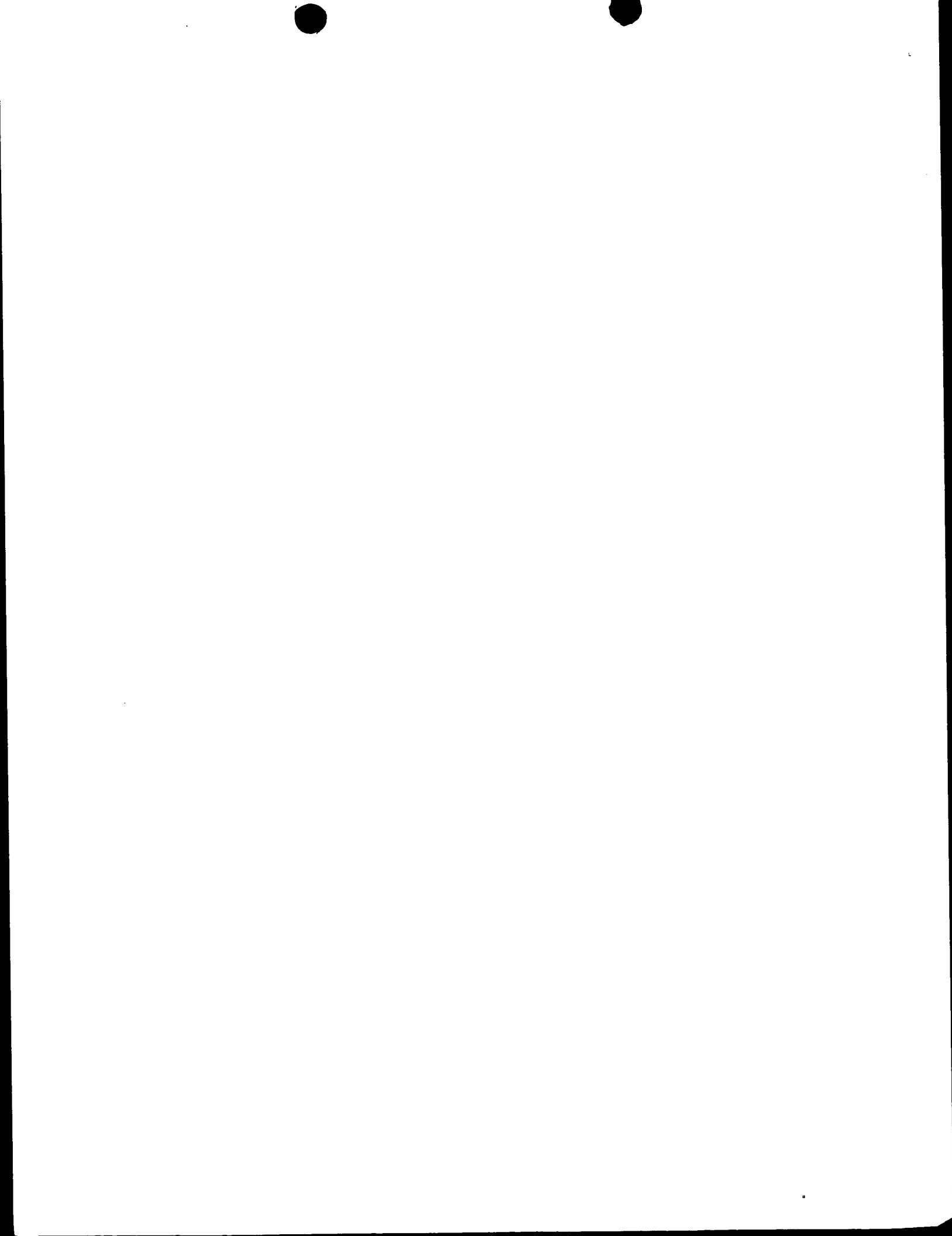
- the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

 contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4. The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages _____ the claims, Nos. _____ the drawings, sheets/fig _____5. This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



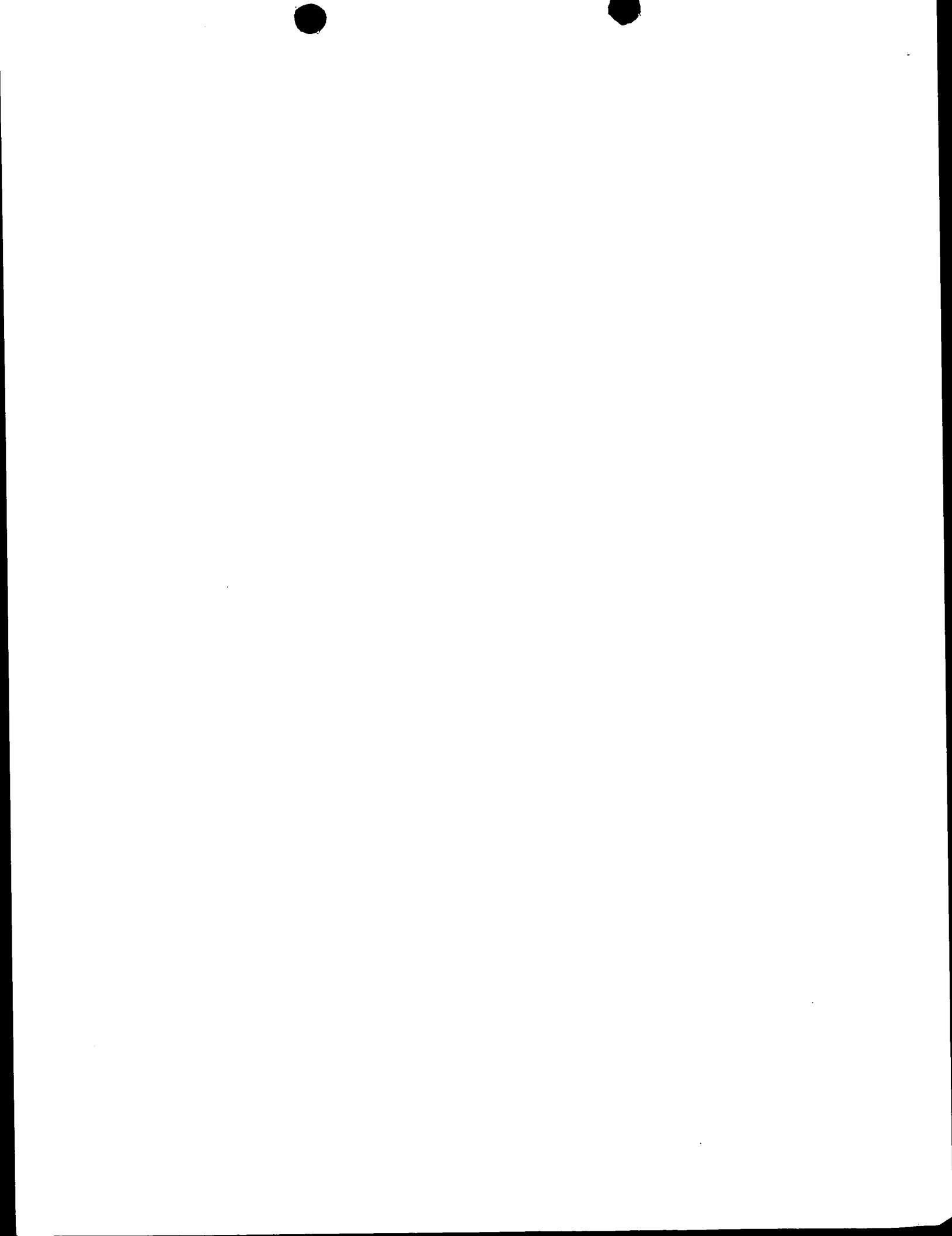
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/DE 00/01416**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

Continuation of: Box I.5

The amendments submitted with the letter of 27 March 2001 introduce substantive matter which, contrary to PCT Article 34(2)(b), goes beyond the disclosure in the international application as filed.

In the process described in Claims 1-5 "impregnation of normal tissue" in gene therapy was amended to "impregnation of normal tissue surrounding the tumour tissue". No basis could be found in the original application documents for this newly introduced feature. The subject matter of the set of claims submitted with the above-indicated letter therefore goes beyond the original disclosure of the international application and is therefore refused in accordance with PCT Article 34(2)(b). The present international preliminary examination report has therefore been established on the basis of the set of claims submitted with the application.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE00/01416

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- restricted the claims.
- paid additional fees.
- paid additional fees under protest.
- neither restricted nor paid additional fees.

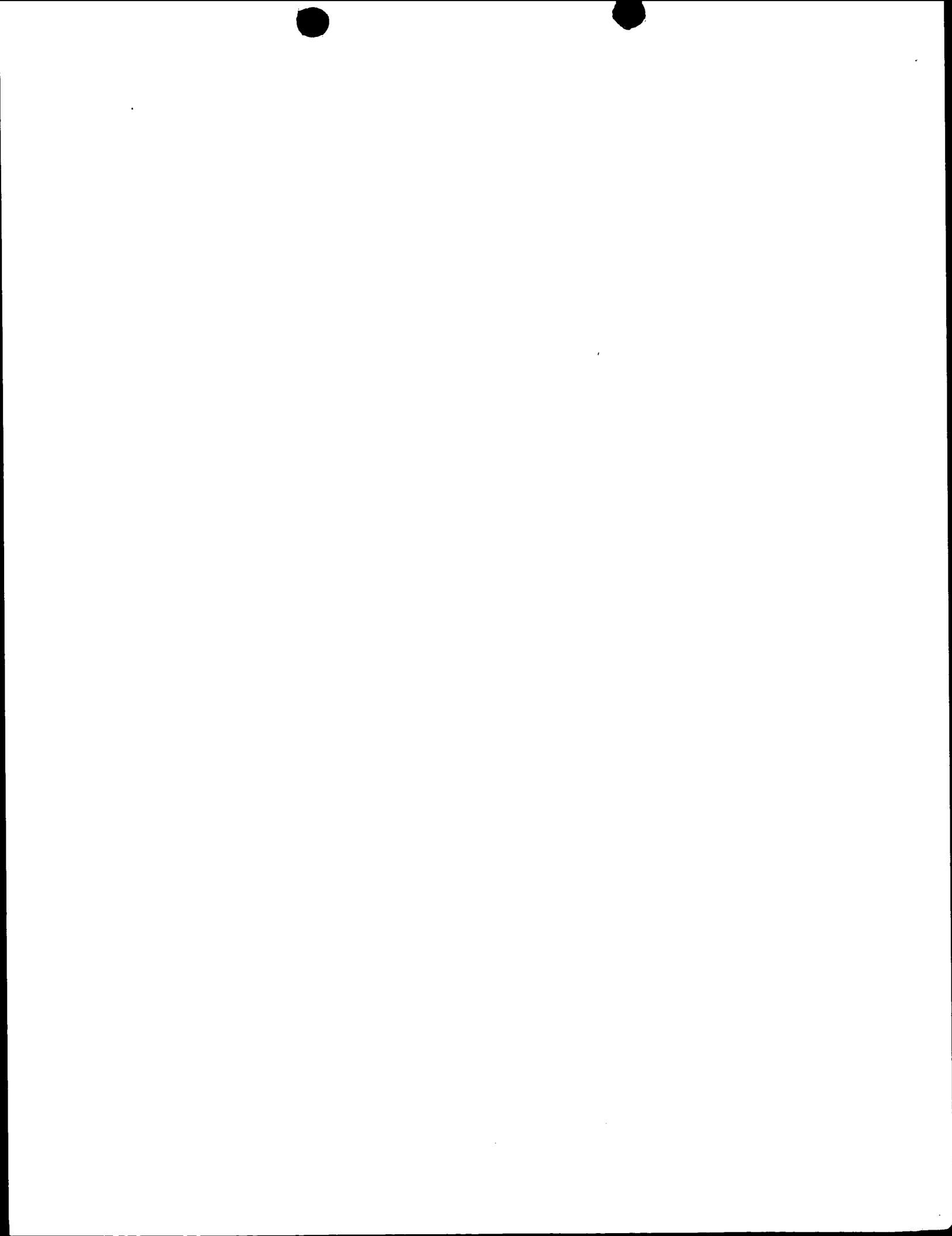
2. This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose, according to Rule 68.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is

- complied with.
- not complied with for the following reasons:

4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:

- all parts.
- the parts relating to claims Nos. _____



Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

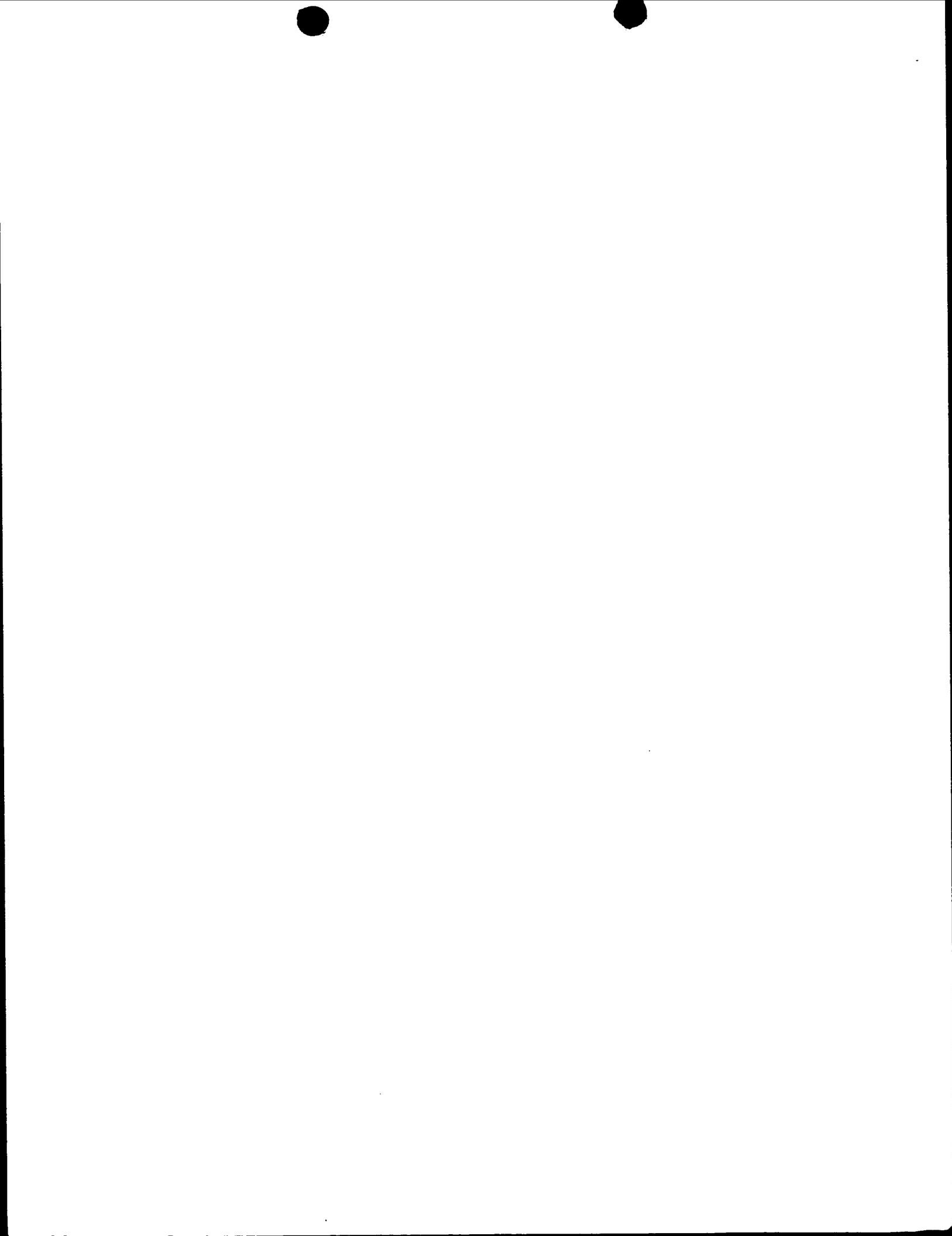
The International Preliminary Examining Authority considers that the present application does not meet the requirements for unity of invention within the meaning of PCT Article 34(3) and PCT Rule 13.1.

According to PCT Rule 13.1, the international application shall "relate to one invention only or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept". A technical relationship within the meaning of PCT Rule 13.2 should be present involving one or more of the same or corresponding special technical features. The inventive concept and the special technical features must be novel over the prior art and non-obvious.

The concept unifying the various vectors and processes in the present application is the application thereof to non-tumour tissue to block metastasis. However, this concept was disclosed in D1. D1 describes an adenoviral vector which expresses ATF, an N-terminal fragment of urokinase, under the control of the CMV promoter. Systemic administration of the vector to mice blocked renal metastasis (page 1108, right-hand column, section 2; Figure 7).

Said concept was also disclosed in D7 and D8.

Since the unifying concept is not novel over the prior art and no further special technical features within the meaning of PCT Rule 13.2 are discernible, the requirement for unity of invention is not met. Therefore, in the

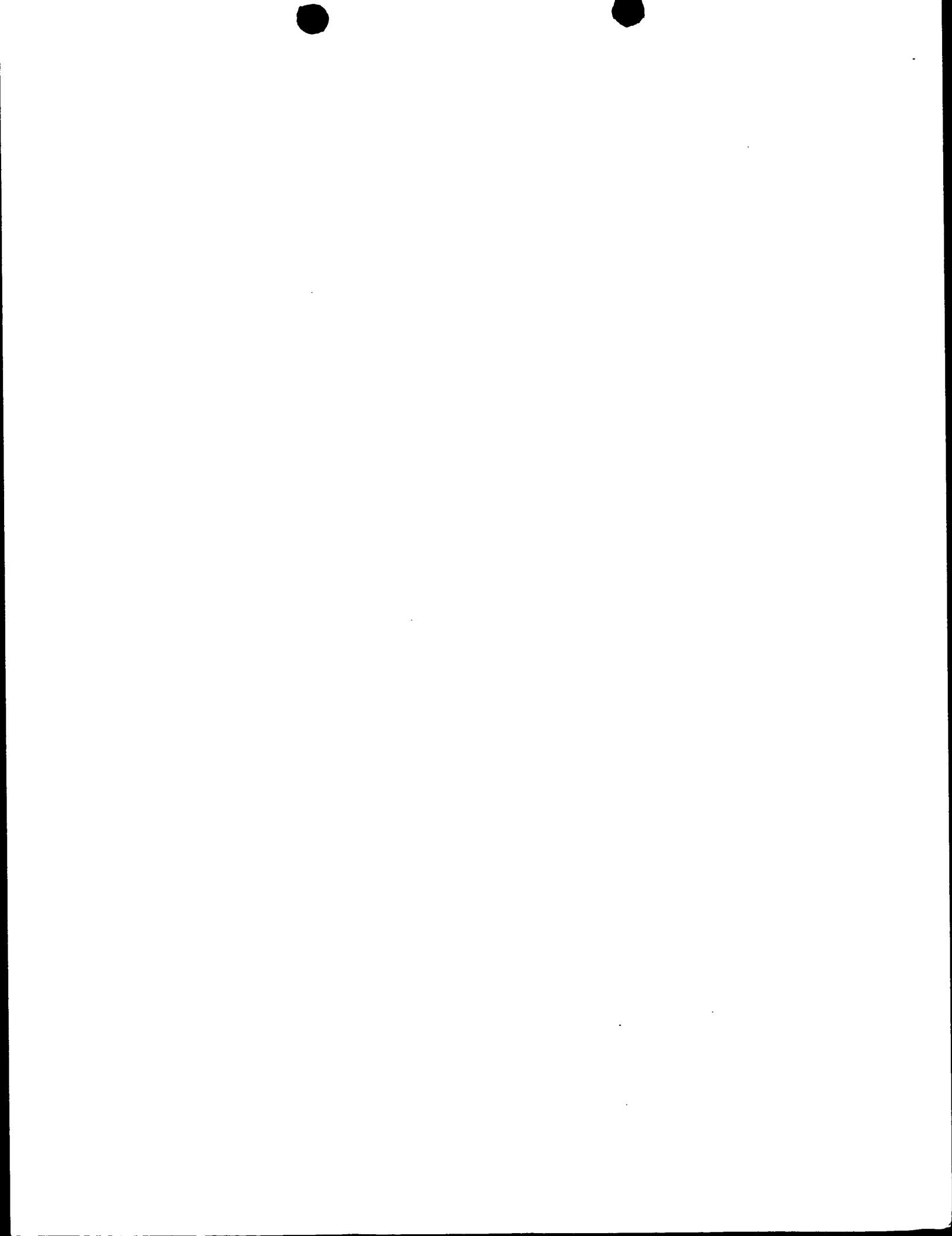


INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORTInternational application No.
PCT/DE 00/01416**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: IV

present application each vector and each process with a specific vector should be considered a separate invention.



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 00/01416

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|--|-----|
| Novelty (N) | Claims | <u>7, 8, 13, 14, 17, 27-40</u> | YES |
| | Claims | <u>1-6, 9-12, 15, 16, 18-26, 41-44</u> | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | | YES |
| | Claims | <u>1-51</u> | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | <u>1-51</u> | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

The following documents are referred to:

D1: LI H ET AL.: 'Adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice', GENE THERAPY, vol. 5, no. 8, August 1998 (1998-08), pages 1105-1113

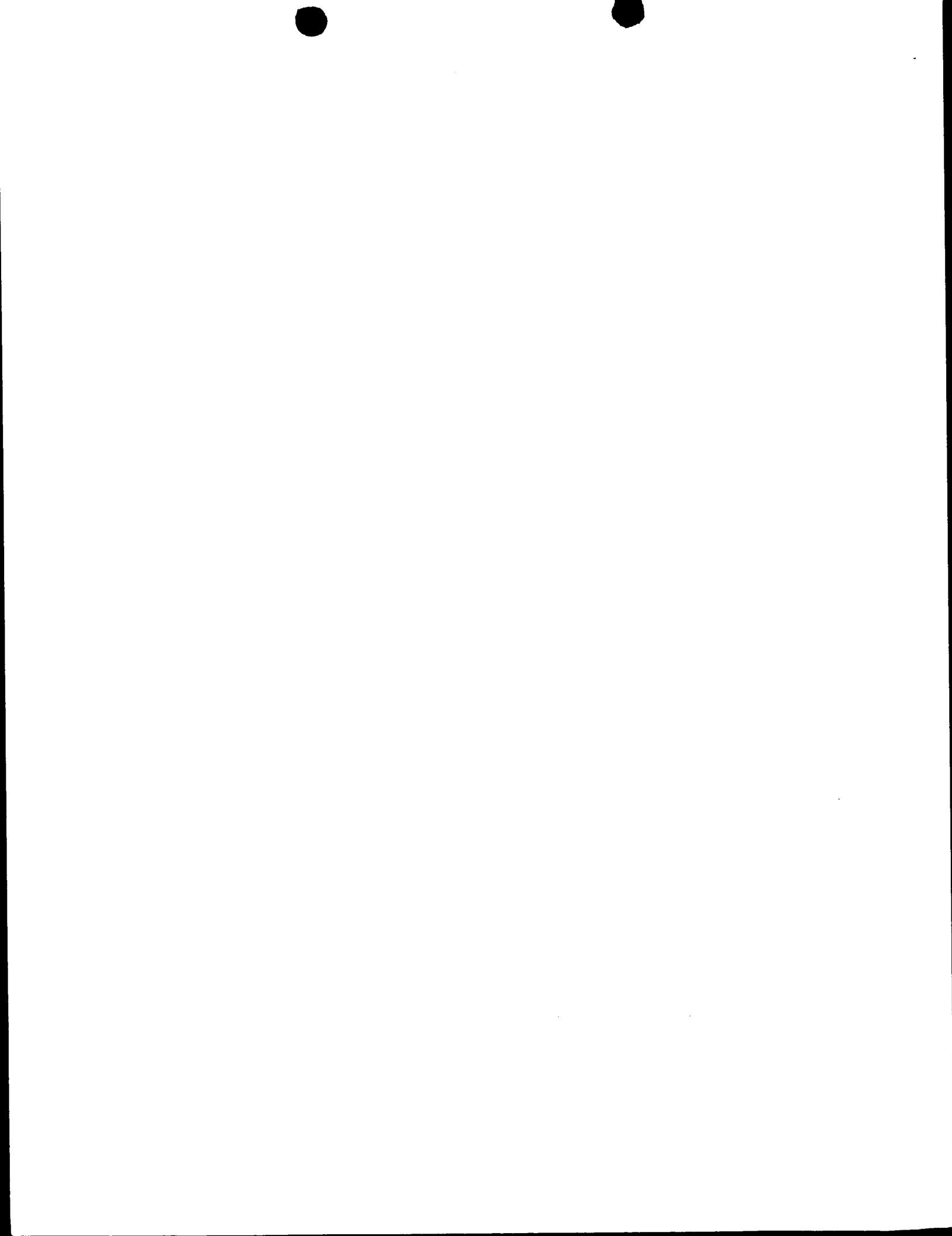
D2: KAWAMATA H ET AL.: 'Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma', INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER (1995) 63/5 (680-687)

D3: US-A-5 731 192 (REEDERS STEPHEN T ET AL.) 24 March 1998 (1998-03-24)

D4: HUANG Y W ET AL.: 'Adhesion molecules as targets for cancer therapy', HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY (1997 APR) 12 (2) 467-77. REF: 119

D5: MARAIS R ET AL.: 'A cell surface tethered enzyme improves efficiency in gene-directed enzyme prodrug therapy', NATURE BIOTECHNOLOGY (1997) 15/13 (1373-1377), 32 REFERENCE(S) CODEN: NABIFO ISSN: 1087-0156

D6: BOEDEKER B ET AL.: 'Design of transmembrane suicide fusion genes for genetic manipulation of T-cells', BLOOD, vol. 86, no. 10 SUPPL. 1, 1995, page 995A



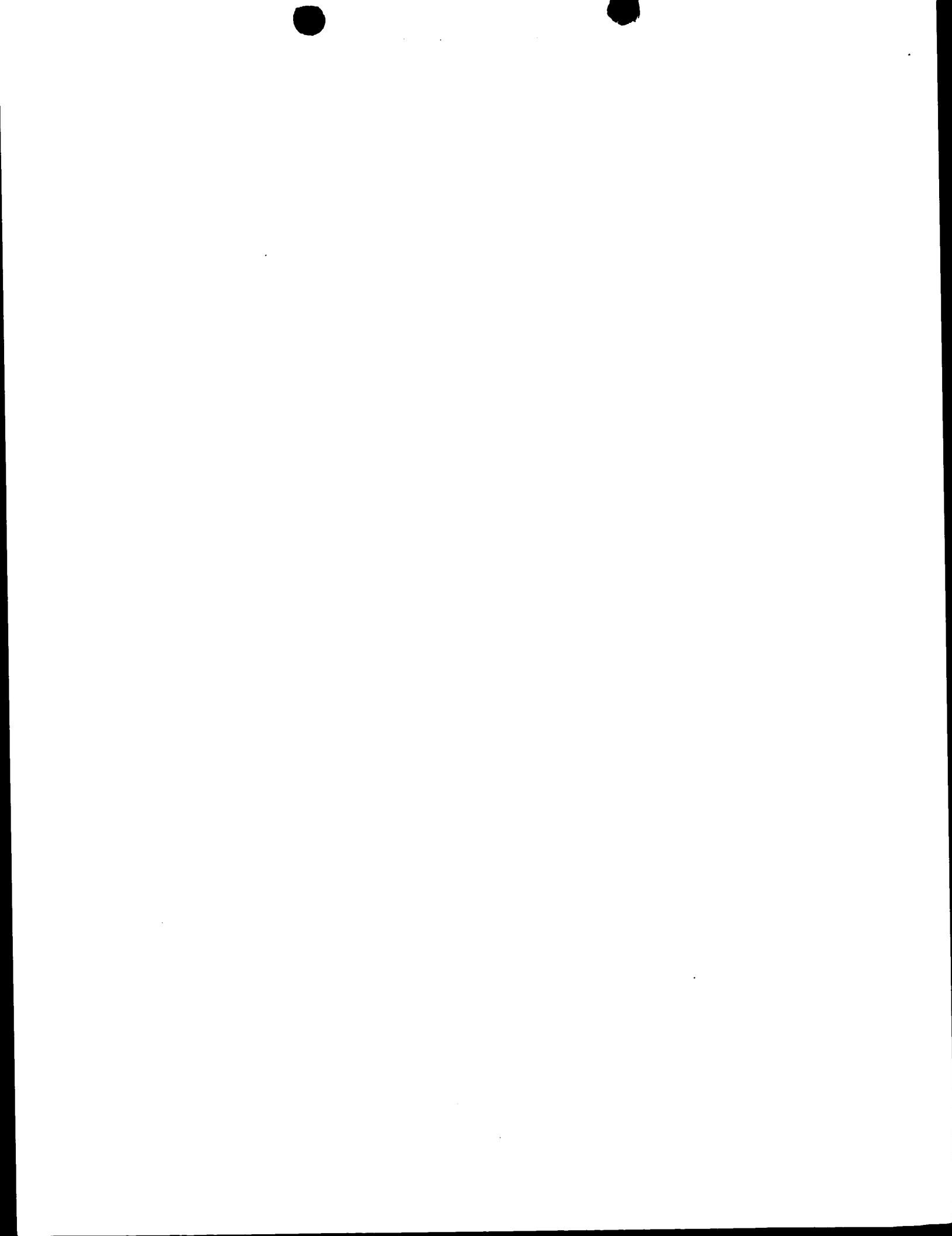
- D7: BLEZINGER P ET AL.: 'Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene', NATURE BIOTECHNOLOGY (1999 APR) 17(4) 343-8
- D8: DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 10 February 1999 (1999-02-10) SCHULTZ JAN ET AL.: 'Long-lasting anti-metastatic efficiency of interleukin 12-encoding plasmid DNA', Database accession no. PREV199900145697 & HUMAN GENE THERAPY, vol. 10, no. 3, 10 February 1999 (1999-02-10), pages 407-417, ISSN: 1043-0342

1. The present application pertains to agents and processes for treatment and prophylaxis of neoplastic diseases within the framework of gene therapy. Gene transfer vectors are applied to non-tumour tissue (normal tissue). The vectors contain genes that block tumour formation and, in particular, metastasis.

In the embodiment described a TIMP-2-expressing adenovirus was given intravenously to mice. The adenovirus blocks metastasis in the liver.

2. The present application does not meet the requirements of PCT Article 33(2) because the subject matter of Claims 1-6, 9-12, 15, 16, 18-26 and 41-44 is not novel.

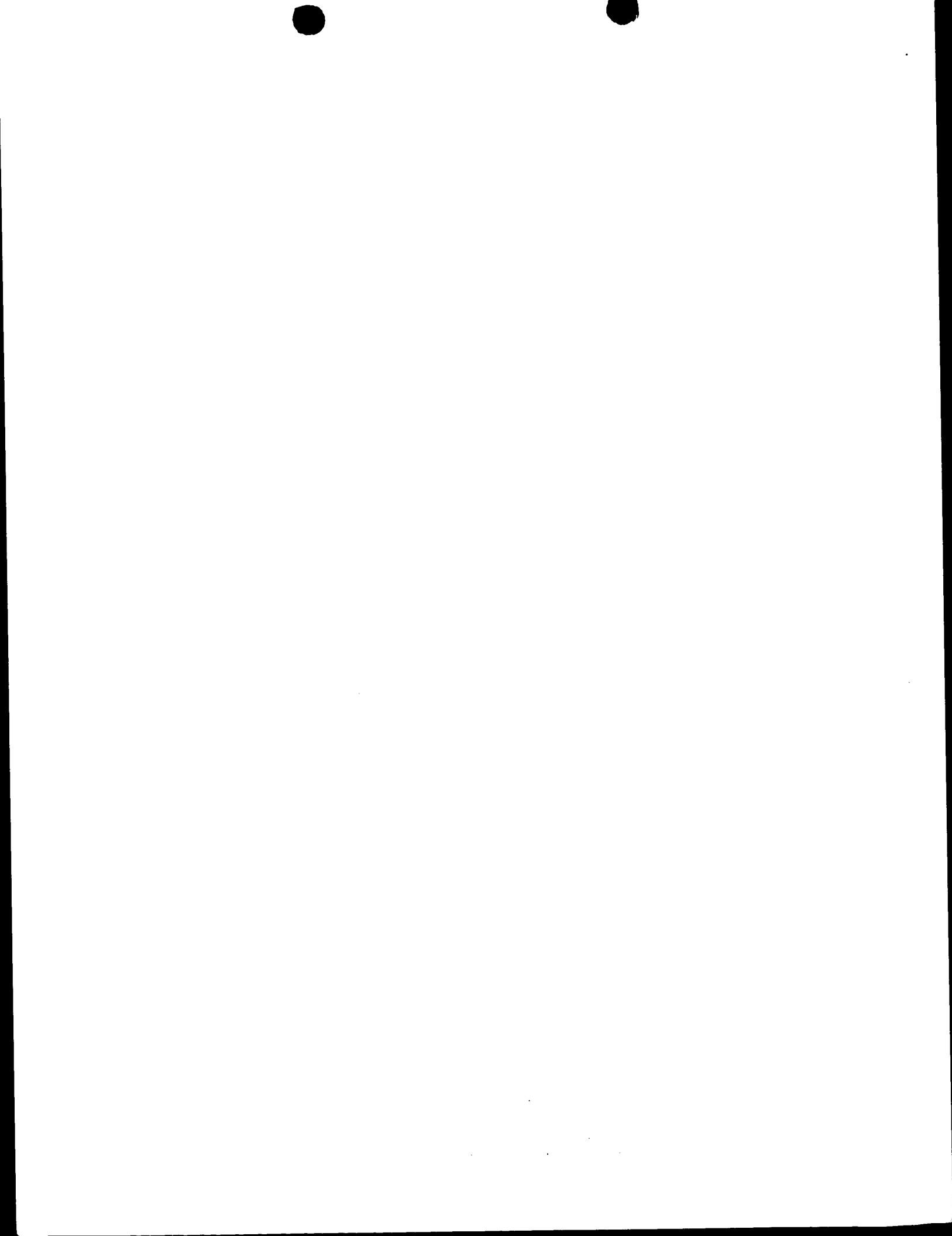
2.1 The wording of product Claim 1 yields a very broad range of protection. The feature "directed at the impregnation of normal tissue" is unclear (see Box VIII). For the purposes of the following analysis it is understood as per the description (page 3, paragraph 1) to mean the transduction of non-tumour



tissue. In this sense the said feature excludes only those vectors that are specific for tumour tissue. In fact, however, most conventional promoters, vectors or genes are ubiquitously "directed" and the indicated feature is thus *de facto* non-limiting over the prior art and the range of protection is very broad. Claim 1 and the claims dependent on it therefore comprise virtually all vectors that contain a gene for the prophylaxis and treatment of neoplastic diseases.

This comment likewise applies to dependent claims that specify a particular gene. For this reason Claims 10-12, Claims 15-16, Claims 18-19, Claims 20-22 and Claims 23-24 are not novel over D2, D3, D4, D5 and D6, respectively. These citations disclose vectors containing the relevant gene for the corresponding claims.

- 2.2 D1 describes an adenoviral vector which expresses ATF, an N-terminal fragment of urokinase, under the control of the CMV promoter. Systemic administration of the vector to mice blocked renal metastasis (page 1108, right-hand column, section 2; Figure 7). D1 is therefore prejudicial to the novelty of Claims 1-6, 9, 25, 26 and 41-44.
3. The present application does not meet the requirements of PCT Article 33(3) because the subject matter of Claims 1-51 does not involve an inventive step.
- 3.1 Claims 1-51 pertain to a large number of different vector systems for expressing various tumour-suppressive genes. All the vector systems and



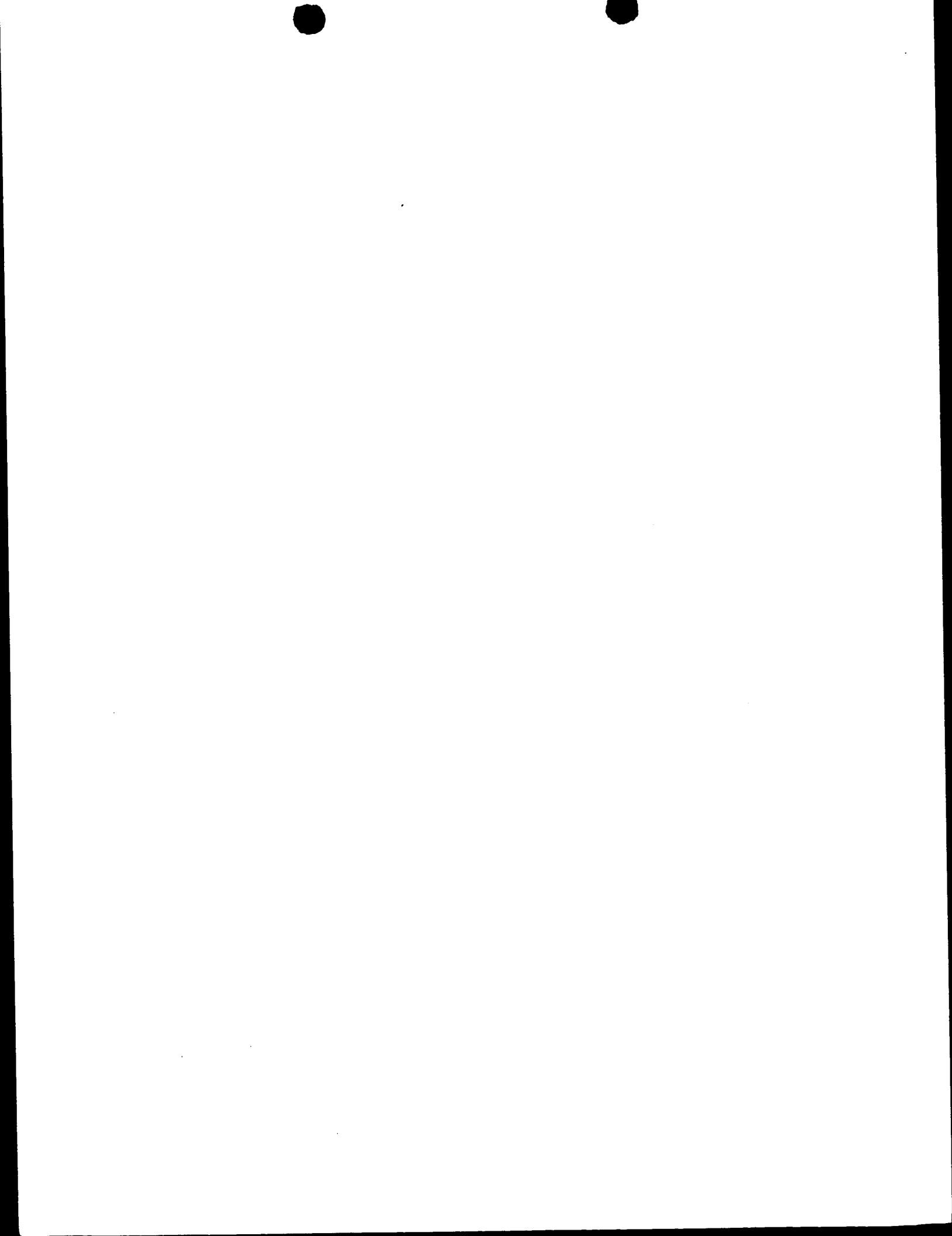
promoters indicated in the claims are known from the literature and belong to the standard repertoire of molecular biologists. The genes and their antineoplastic activity are also known.

Moreover, the possibility of treating tumours with gene-bearing vectors is known, for example, from D1.

The contribution of the present application therefore consists merely in citing various known vectors containing known genes. This does not demonstrate inventive step within the meaning of PCT Article 33(3).

However, if, nevertheless, it were assumed that individual vector systems in the present application were inventive, they would not be satisfactorily supported by the description within the meaning of PCT Articles 5 and 6. With the exception of AdTIMP-2, the vectors are described only very generally: that is, without going beyond the prior art. Therefore, a person skilled in the art can deduce nothing from the description that is not already known from the prior art. However, if an inventive contribution going beyond the prior art were present, a person skilled in the art should be able to carry it out on the basis of the description (PCT Article 5).

The sole vector to be described in detail is the TIMP-2-expressing adenovirus. The desired technical effect was also shown experimentally for this virus. Therefore, AdTIMP-2 could be considered to be supported by the description.



3.2 The above-indicated problems with inventive step and novelty are due to the wording of the claims, which allows the scope of protection to become too broad.

Below we discuss whether restriction to the specific, experimentally confirmed embodiment could yield inventive step.

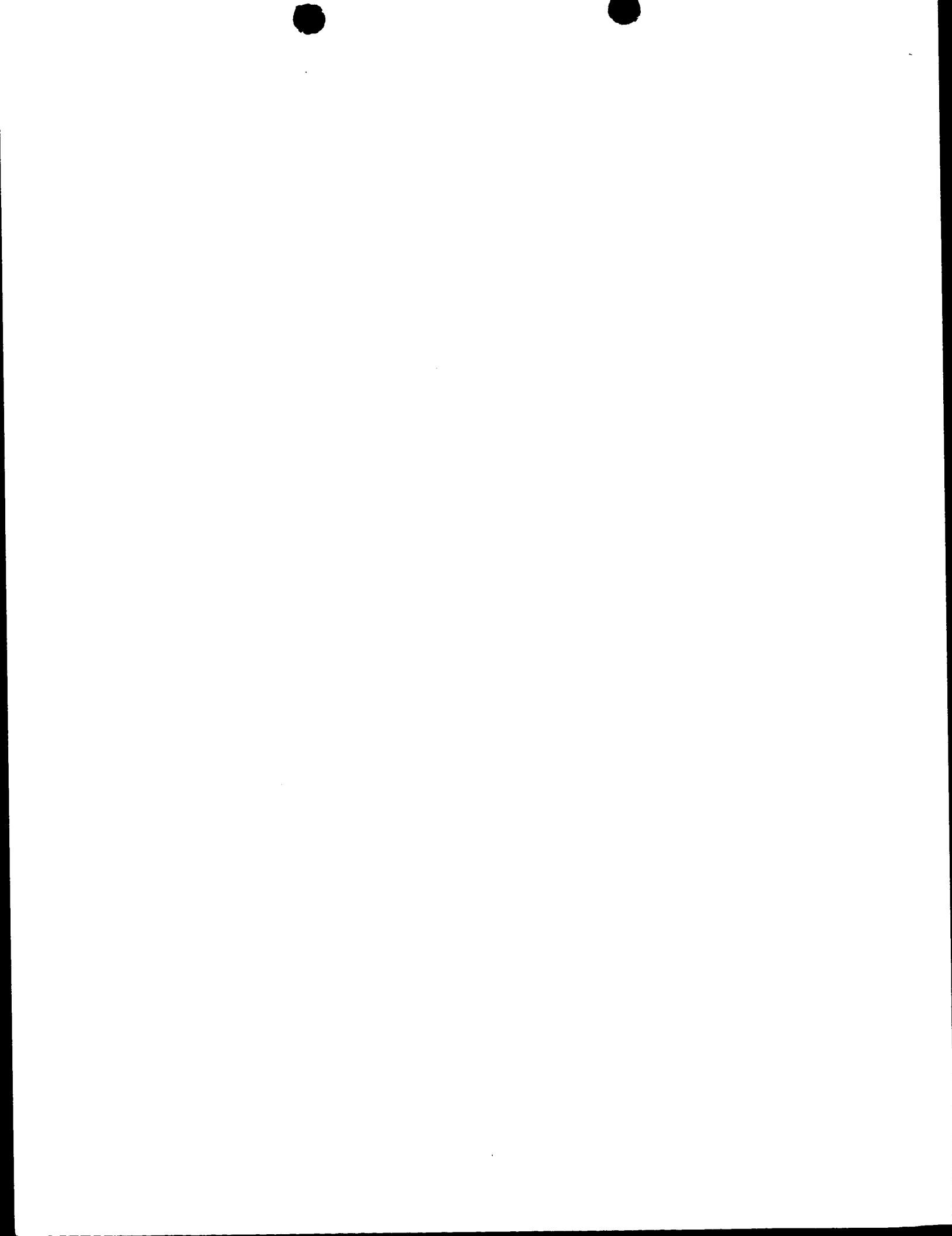
The specific use pertains to the process for systemic use of the TIMP-2-expressing adenovirus. This was shown to block renal metastases in mice.

The present subject matter differs from D1, which is considered to be the closest prior art, in that TIMP-2 is used as a transgene instead of ATF.

The problem addressed therefore consists in providing an alternative process for the treatment and prophylaxis of neoplastic diseases using systemically administered viral vectors.

D2 (pages 683-684, Table 2) discloses that TIMP-2 exerts anti-tumorigenic and in particular anti-metastatic activity in the lung. D6 (page 166, left-hand column, lines 10-15) also indicates that recombinant TIMP-2 inhibits pulmonary metastasis.

However, substitution for ATF of another known metastasis-inhibiting gene in the said process cannot be considered inventive. Thus, the contribution of the present application is reduced merely to the selection of another gene from among many possible genes (e.g. urokinase or the other genes mentioned in the application). Since no special and unexpected properties exhibited by TIMP-

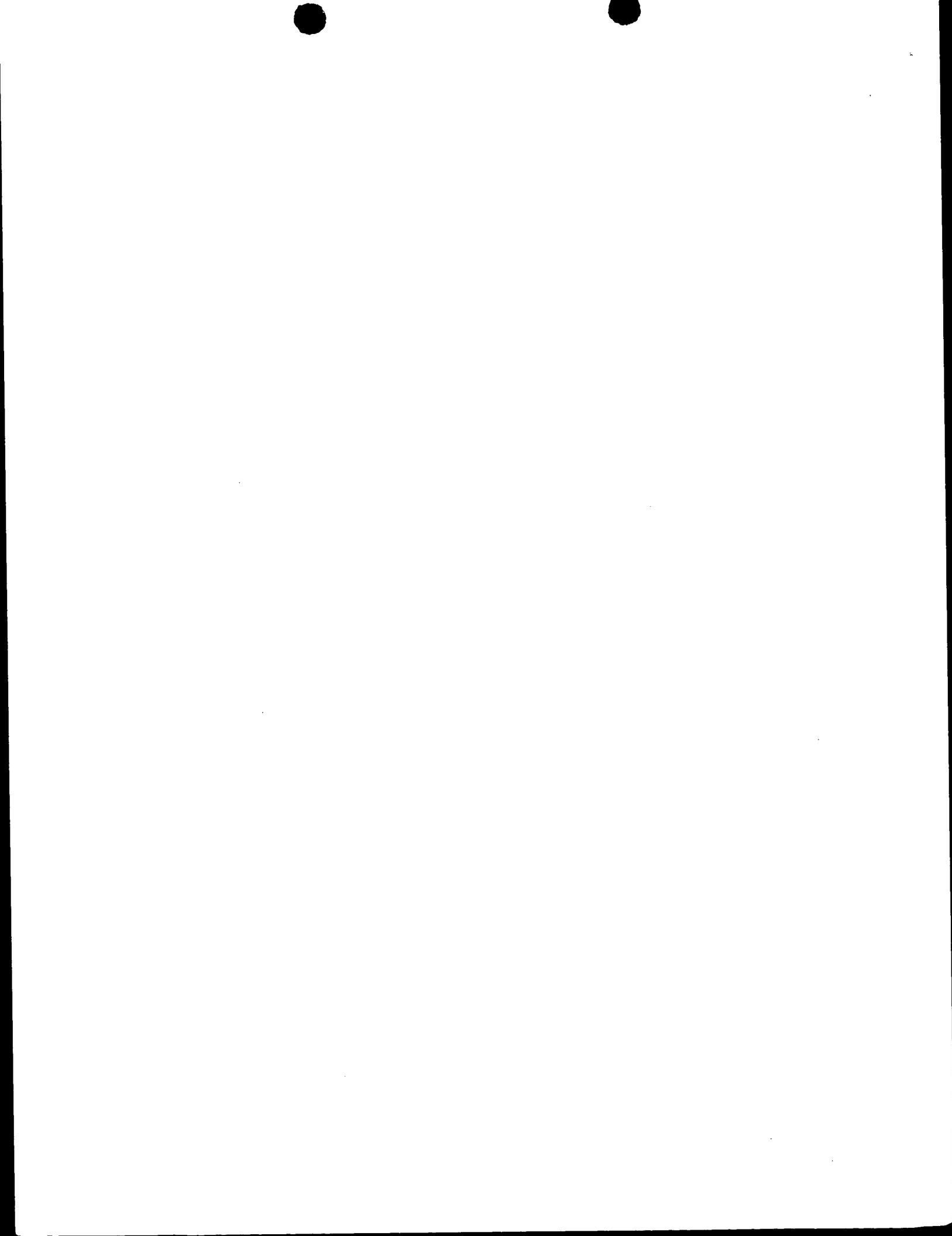


INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 00/01416

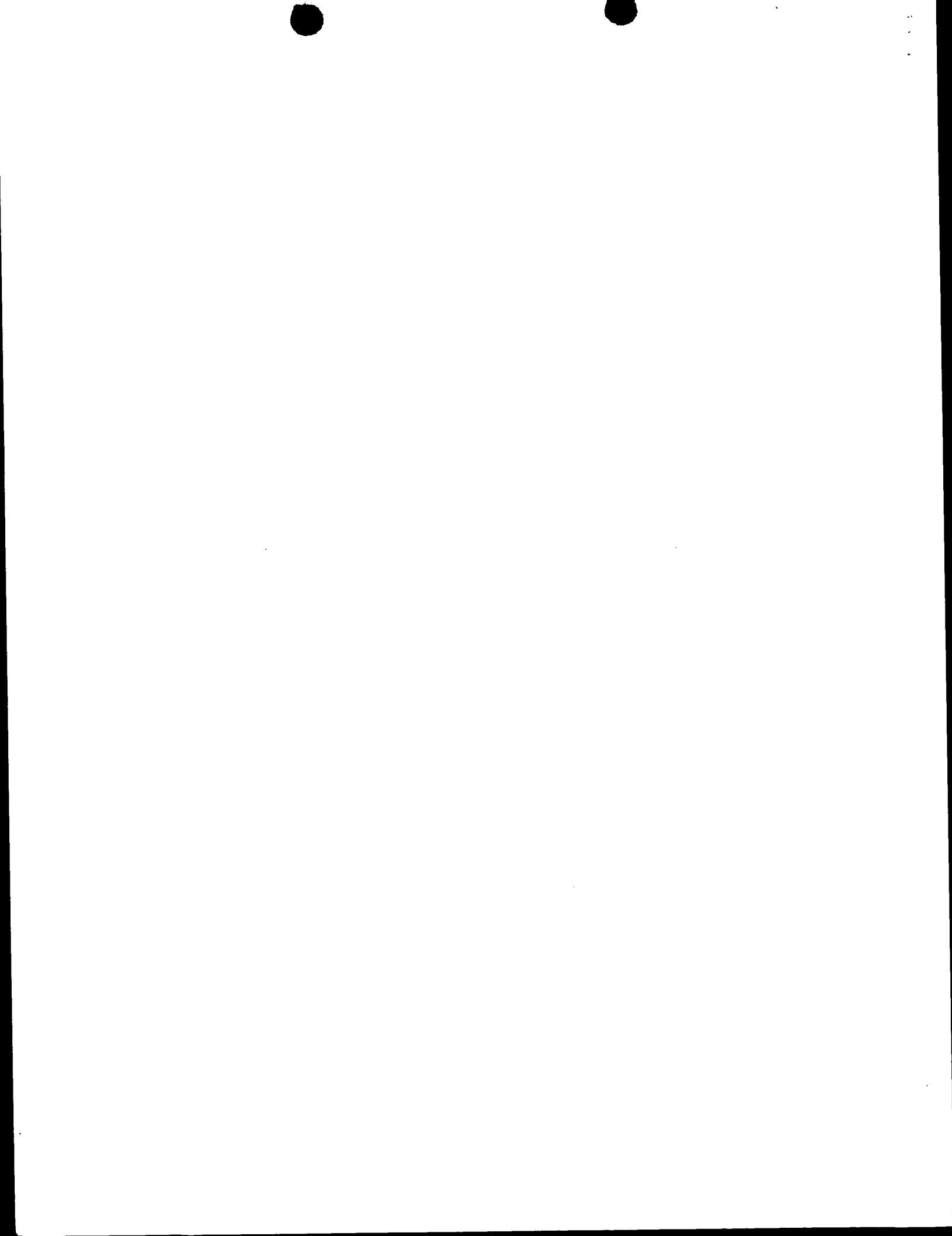
2 compared with the said other genes are discernible, the selection appears to be merely random and not to involve an inventive step within the meaning of PCT Article 33(3).



VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. The phrase "impregnation of normal tissue" is not generally recognized in the relevant specialist area and is therefore unclear within the meaning of PCT Article 6 and PCT Rule 10.1(e) (cf. PCT Guidelines, Section IV, Chapter II-4.15).
2. Claims 1, 2, 13, 17 and 31 do not meet the requirements of PCT Article 6 because the subject matter for which protection is sought is not clearly defined. These claims attempt to define their subject matter in terms of the result to be achieved, and in doing so merely state the problem addressed.
3. The PCT Contracting States do not have uniform criteria for assessing the industrial applicability of Claims 2-4, 21 and 22 in their present form. Patentability may depend on the wording of the claims. The EPO, for example, does not recognize the industrial applicability of claims to the medical use of a compound; it does, however, allow claims to the first medical use of a known compound or the use of such a compound in the manufacture of a drug for a new medical application.



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|--|--|--|--|
| (51) Internationale Patentklassifikation 7 : A61K 48/00 | | A2 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/66176 |
| | | | (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. November 2000 (09.11.00) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01416 | | (81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). | |
| (22) Internationales Anmeldedatum: 2. Mai 2000 (02.05.00) | | | |
| (30) Prioritätsdaten: 199 19 865.9 30. April 1999 (30.04.99) DE | | | |
| (71)(72) Anmelder und Erfinder: BRAND, Karsten [DE/DE]; Jagowstrasse 30, D-10555 Berlin (DE). | | | |
| (72) Erfinder; und | | | |
| (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BAKER, Andrew [DE/DE]; Hillview, 24 Round Riding Road, Dumbarton G82 2HW (DE). STRAUSS, Michael [DE/DE]; Charlottenstrasse 17, D-13156 Berlin (DE). | | | |
| (74) Anwalt: BAUMBACH, F.; Robert-Rössle-Strasse 10, D-13125 Berlin (DE). | | | |

(54) Title: AGENT FOR GENE THERAPY AND FOR THE PREVENTION OF METASTASES, AS WELL AS FOR THE GENE THERAPY OF TUMORS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR GENTHERAPIE UND ZUR PRÄVENTION VON METASTASEN BZW. ZUR GENTHERAPIE VON TUMOREN

(57) Abstract

The invention relates to an agent for the prophylaxis and treatment of primary tumors and metastases. The invention relates in particular to a gene therapy vector and a DNA sequence with an enhancer/promotor component and a transgene. The individual components of the agent are chosen such that they impregnate the normal tissue of potentially or already affected organs against invasive tumor cells. This prevents the formation of metastatic sites, induces the shrinkage of existing sites or limits the invasion of primary tumors.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die Prophylaxe und Therapie von Primärtumoren und Metastasen. Die essentiellen Komponenten der Erfindung betreffen einen gentherapeutischen Vektor und eine DNA-Sequenz mit Enhancer/Promotor-Komponente und Transgen. Die einzelnen Komponenten des Mittels sind so ausgewählt, daß sie eine Imprägnierung des Normalgewebes potentiell oder bereits betroffener Organe gegenüber invasiven Tumorzellen gewährleisten, was die Entstehung metastatischer Herde verhindert, die Rückbildung bestehender Herde induziert oder die Invasion von Primärtumoren begrenzt.

Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidschan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |

Mittel zur Gentherapie und zur Prävention von Metastasen bzw. zur Gentherapie von Tumoren

Beschreibung

Die bei weitem häufigste Todesursache maligner Tumorerkrankungen ist die Organmetastasierung. Während der Primärtumor zumindest in frühen und mittleren Stadien chirurgisch reseziert werden kann, ist dies im Fall der Metastasierung selten möglich. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, können die konventionellen Methoden der Chemotherapie und Bestrahlung, wenn überhaupt, dann nur vorübergehende Besserungen des klinischen Bildes metastasierter Tumoren erreichen.

Zu den häufigsten Tumoren gehören kolorektale Karzinome. Lebermetastasen kolorektalen Ursprungs sind die häufigste Todesursache für Patienten mit kolorektalen Karzinomen. Da sie nach chirurgischer Entfernung des Primärtumors häufig über einen längeren Zeitraum die einzige Manifestation der Erkrankung darstellen, sind sie ein mögliches Ziel für kurative Therapieansätze (Dreben, JA and Niederhuber, JE. (1993) Cancer of the lower gastrointestinal tract - Colon cancer. In: Niederhuber, JE ed. Current Therapy in Oncology. St. Louis, MO: Decker, 426-431). Die potentiell kurative chirurgische Entfernung von Lebermetastasen ist aber nur für einen kleinen Prozentsatz der Patienten möglich und für die Chemotherapie sind zwar vorübergehende Remissionen aber keine Lebensverlängerung gezeigt. Daher besteht dringender Bedarf nach alternativen Therapieformen.

Die seit etwa 10 Jahren in der Entwicklung befindlichen gentherapeutischen Ansätze besitzen aufgrund ihrer Komplexität ein gegenüber konventionellen Therapieformen dramatisch erhöhtes Maß an Regulierbarkeit. Diese kann im Bereich der Krebsgentherapie unter anderem zum tumorspezifischen Targeting der Vektoren oder der Beschränkung der Genexpression auf Tumorgewebe und zur spezifischen Adaptation der transferierten Transgene an Angriffspunkte des jeweiligen Tumortyps genutzt werden.

Abgesehen von immunologischen Herangehensweisen, haben die bisher verfolgten gentherapeutischen Ansätze, wie schon die konventionellen Methoden, fast ausschließlich das infiltrierende Tumorgewebe zum primären Angriffspunkt. Dies

birgt die Problematik unzureichenden Erreichens des Tumors, welcher sich mit erhöhtem intratumoralem Druck und eingeschränkter Blutversorgung präsentiert und selbst bei der üblicherweise durchgeführten direkten intratumoralen Injektion gentherapeutischer Transfervehikel nur ungenügend getroffen wird. Im Falle multipler Metastasierung hat sich gezeigt, daß sich bei der dann erforderlichen systemischen oder regionalen Gabe der Vektoren das umgebende Normalgewebe sogar wesentlich besser infizieren läßt als die Tumorzellen.

Die Erfindung hat das Ziel, die Prophylaxe und die Therapie von Tumormetastasen und Primärtumoren zu verbessern.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Die gemäß der Erfindung entwickelte Strategie umgeht die Problematik der schwierigen Erreichbarkeit des Tumorgewebes, indem das gut zu erreichende Normalgewebe zum primären gentherapeutischen Ziel erklärt wird. Das Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß das normale Organgewebe direkt am Ort einer potentiellen oder stattgehabten Metastasierung mit Abwehrfunktionen ausgestattet wird, die eine Etablierung bzw. ein weiteres Wachstum der Metastasen verhindern. Ebenso kann die weitere Ausbreitung eines inoperablen Primärtumors verhindert werden. Diese Strategie der Imprägnierung des gesunden Gewebes unterscheidet sich grundlegend von allen bisher durchgeführten gentherapeutischen und nicht-gentherapeutischen Ansätzen. Gegenüber der systemischen oder intraperitonealen Applikation z.B. synthetischer Proteaseinhibitoren (Nelson, N.J. (1998) Inhibitors of Angiogenesis enter phase III testing, J Natl. Cancer Inst., 90, 960-963) besteht der Vorteil des gentherapeutischen Ansatzes darin, lokal im Zielorgan sehr hohe Konzentrationen an Wirkstoff zu erreichen mit dem Vorteil der Verringerung von Nebenwirkungen und der Möglichkeit der gleichzeitigen Applikation mehrerer Inhibitoren (s.u.). Außerdem ist eine dauerhafte Genexpression nach einmaliger Vektorapplikation kostengünstiger und nebenwirkungsärmer als die wiederholte Gabe synthetischer Substanzen über einen längeren Zeitraum.

In folgende klinischen Szenarien läßt sich der oben beschriebene Ansatz einfügen:

1. Die präoperative oder intraoperative Vektorapplikation in Zielorgane, um die Extravasion etwaiger bei Operation des Primärtumors losgelöster metastatischer Tumorzellen zu unterbinden.
2. Die adjuvante über Jahre dauernde kontinuierliche Expression von Inhibitoren im Zielgewebe zur Verhinderung des Auswachsens bzw. zum Abtöten okkuler Mikrometastasen vor allem bei Hochrisikogruppen wie dem operierten Mammakarzinom mit Lymphknotenbefall.
3. Die Begrenzung des Wachstums bereits etablierter Metastasen oder inoperabler Primärtumoren.

Ausführungsbeispiel 1: Gentherapie kolorektaler Lebermetastasen durch adenoviralen Transfer von Metalloproteinaseinhibitoren (TIMPs) in das Leberparenchym

Metastasen kolorektaler Karzinome produzieren verschiedene Proteasen, die sie zur Intravasion und Extravasion sowie zur Invasion im Zielgewebe benötigen. Darunter sind verschiedene Metalloproteinasen (MMPs) und hier insbesondere die MMP-2 und MMP-9, die für die Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) verantwortlich sind (Duffy, M.J. and McCarthy, K. (1998) Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and targets for therapy (review), Int. J. Oncol., 12, 1343-48). Von den MMPs-2 und -9 wird vorzugsweise Kollagen IV als Hauptkomponente der Basalmembranen abgebaut. Im Zuge dieser Erkenntnisse wurden synthetische Proteaseinhibitoren entwickelt, die klinisch bereits eingesetzt werden und in einigen Fällen bereits die Phase III der klinischen Testung erreicht haben (Nelson, N.J. (1998) Inhibitors of Angiogenesis enter phase III testing, J Natl. Cancer Inst., 90, 960-963).

Die gemäß der Erfindung entwickelte therapeutische Grundidee besteht darin, Hemmstoffe von Metalloproteinasen durch das Leberparenchym sezernieren zu lassen, um metastatische Tumorzellen an ihrer Extravasion zu hemmen, die weitere Infiltration bereits etablierter Metastasen zu unterbinden und die Versorgung der Tumors mit Gefäßen durch Hemmung von Gefäßentwicklung zu unterbinden. Zunächst wurde der Gewebsinhibitor der Metalloproteinase 2 (TIMP-2) ausgewählt.

Dieser Inhibitor, wie auch mehrere verwandte Stoffe, sorgt physiologischerweise für eine Begrenzung der MMP-Aktivität bei Umbauprozessen. Durch Bindung an MMP-2 kann TIMP-2 deren Aktivität hemmen.

Als Vektor zum Gentransfer wurden Erstgenerations-Adenoviren, die zu den etabliertesten Gentransfersystemen gehören (Brand, K. und Strauss, M (1998) Molekulare Grundlagen des Gentransfers und Anwendung für die Gentherapie. In: Ruckpaul,D. und Ganzen, D. (Hrsg.) Handbuch der Molekularen Medizin, Bd 2 Tumorerkrankungen, Springer, Berlin, Heidelberg, New York) verwendet. Diese Vektoren, die aufgrund des Fehlens des adenoviralen E1-Gens nicht replizieren können, infizieren mit hoher Effizienz epitheliale Zellen und können in den notwendigen großen Mengen generiert werden.

a) Zum Nachweis der Sekretion von TIMP-2 durch Hepatozyten *in vitro*, wurden A2 Zellen (Hepatozytenzelllinie aus p53 k.o Mäusen) mit unterschiedlichen multiplicities of infection (MOIs) Ad-TIMP-2 infiziert. Die Konstruktion von Ad-TIMP-2 ist beschrieben worden (Baker, A.H., Wilkinson, G.W., Hembry, R.M., Murphy, G., and Newby, A.C. (1996) Development of recombinant adenoviruses that drive high level expression of the human metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 genes: characterization of their infection into rabbit smooth muscle cells and human MCF-7 adenocarcinoma cells. Matrix Biol. 15: 383-395). Das Virus beinhaltet die humane TIMP-2 cDNA unter der Kontrolle des CMV Promotors. 24h oder 48h später wurde der Zellkulturüberstand (ZKÜ) gewonnen. 10 µl wurden auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen und nach elektrophoretischer Auf trennung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Für den immunologischen Nachweis wurde ein monoklonaler Antikörper (T2-101, Ab-1 vonDianova, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Der Western Blot zeigte eine starke TIMP-2 Bande im Überstand von Ad-TIMP-2 infizierten Zellen und keine Banden in nicht infizierten und Kontrollvirus-infizierten Überständen.

b) Die Funktionsfähigkeit von TIMP-2 wurde mittels reverser Zymographie (nach Baker, A.H., Wilkinson, G.W., Hembry, R.M., Murphy, G., and Newby, A.C. (1996) Development of recombinant adenoviruses that drive high level expression of the human metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 genes:

characterization of their infection into rabbit smooth muscle cells and human MCF-7 adenocarcinoma cells. Matrix Biol. 15: 383-395) überprüft. Zellen wurden infiziert, wie unter (a) beschrieben. Der ZKÜ wurde mittels eines Amicon Konzentrators (Lexington, MA, USA) konzentriert. NaN₃, Brij and CaCl₂ wurden zugegeben um eine Endkonzentration von of 0.1%, 0.05% bzw. 5 mM zu erhalten. Die Proben wurden mit nicht reduzierendem Puffer gemischt und auf ein 10% Polyacrylamid/SDS Gel geladen, welches 1 mg/ml Gelatine (porcine skin type I, bloom 300, SIGMA G2500) und 107 ng/ml aktives MMP-2 Protein (Oncogene, Cambridge, MA, USA) enthält. Nach der Elektrophorese, wurde das SDS durch Inkubation für 2 h in 2.5 % Triton X 100 aus dem Gel entfernt . Das Gel wurde über Nacht in 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 0.05% Brij-35, und 0.02% NaN₃ bei 37°C inkubiert. Das Gel wurde mit 0.5% Coomassie Brilliantblau (SIGMA R250, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt, und Banden Gelatinase-nhibitorischer Aktivität, die TIMP-2 representieren erscheinen dann dunkel gegen den verdauten Hintergrund. Die reverse Zymographie zeigte Gelatinase-inhibitorische Aktivität nur in den Überständen Ad-TIMP-2 infizierter Zellen und nicht in Überständen von nicht infizierten oder Kontrollvirus infizierten Zellen.

c) Die Produktion von MMP-2 durch Tumorzellen wurde durch Gelatin Zymographie nachgewiesen. Der ZKÜ verschiedener Zelllinien wurde gesammelt und konditioniert, wie unter (b) beschrieben. Die Zymographie wurde durchgeführt wie unter (b) beschrieben, nur MMP-2 wurde nicht zugeben. Banden der Lyse, die gelatinolytische Aktivität anzeigen, waren gegen den dunklen Hintergrund sichtbar. Unter mehreren Zelllinien zeigten LS 174 Kolontumorzellen die stärkste MMP-2 Aktivität.

d) Zum Nachweis rekombinannten humanen TIMP-2 im Blut von Nacktmäusen wurden verschiedene Dosen Ad-TIMP-2 intravenös in die Schwanzvene von Nacktmäusen injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde Blut abgenommen und Serum gewonnen. Die Proben wurden mittels eines TIMP-2 ELISAs (RPN 2618, Amersham Buchler, Braunschweig, Germany) auf TIMP-2 Gehalt überprüft. Die Ergebnisse zeigen eine Abhängigkeit der TIMP-2 Expression von der applizierten Virusmenge mit einer TIMP-2-Konzentration von 45 µg/ml bei einer Dosis von 3x10¹⁰ pfus (plaque forming units). Die Serumkonzentration an TIMP-2 war über 2 Wochen

stabil. Diese Ergebnisse zeigen, daß TIMP-2 nach intravenöser Injektion in das Blut sezerniert wird.

e) Um das Ausmaß des Gentransfers in die Leber zu prüfen, wurden Adenoviren in die Schwanzvene von Nacktmäusen injiziert. Nach drei Tagen wurden die Tiere getötet und die Lebern in Flüssigstickstoff eingefroren. Zur immunhistochemischen Detektion von TIMP-2 wurde ein monoklonaler Mausantikörper gegen humanes TIMP-2 (1:10, T2-101, Ab-1, Dianova, Hamburg, Germany) verwendet. Ein FITC konjugierter Schaf anti-Mausantikörper wurde als sekundärer Antikörper verwendet. Das Ergebnis der Färbung ergab eine Expression von TIMP-2 durch 40% der Hepatozyten bei einer Dosis von 3×10^{10} pfu und von >80% bei einer Dosis von 6×10^{10} pfu. Eine ähnliche Gentransfereffizienz wurde nach Applikation von Ad- β gal und nachfolgendes X-gal staining dokumentiert.

f) Die Wirksamkeit intravenöser Applikation von Ad-TIMP-2 gegenüber LS 174 abgeleiteten Lebermetastasen wurde mit folgenden Experimenten geprüft. Adenoviren wurden 1 Tag vor oder 10 Tage nach Metastaseninduktion appliziert. Die Metastaseninduktion erfolgte durch Applikation von 2×10^6 LS174 Zellen in die Milz der Tiere. 5 Wochen nach Metastaseninduktion wurden die Tiere getötet und die Tumorgewichte bestimmt. Im präventiven Versuchsansatz wurden an Tag 0 Ad-TIMP-2 oder Ad- β gal Kontrollvirus in einer Dosis von 3×10^{10} pfu, die zu etwa 40% Leberzellinfektion führt, über die Schwanzvene gegeben. Nach 3 Tagen erfolgte die Metastaseninduktion über die oben beschriebene Milzinjektion von Tumorzellen. Nach 4 Wochen wurde das Experiment beendet und die Volumina der Lebertumoren bestimmt. Es zeigte sich, daß sowohl in der unbehandelten Kontrollgruppe, wie auch in der mit Kontrollvirus behandelten Gruppe die Mehrzahl der Tiere eine, die Leber fast vollständig aufbrauchende, Metastasierung aufwiesen, während die mit Ad-TIMP-2 behandelten Tiere in der Mehrzahl makroskopisch tumorfrei waren (Abbildung 1: Unbehandeltes, Ad- β gal behandeltes (Mitte) und Ad-TIMP-2 behandeltes Tier (rechts)).

Die quantitative Auswertung ergab ein Verhältnis des Mittelwertes der Tumorgewichte in den Versuchsgruppen von 1:20 (Ad-TIMP-2: Ad- β gal oder unbehandelt, Abbildung 2, Punkte entsprechen einzelnen Tieren, Balken entsprechen den Mittelwerten). Die histopathologische Untersuchung ergab nur

vereinzelte Mikrometastasen in den makroskopisch tumorfreien Tieren der Ad-TIMP-2 Gruppe. Damit läßt sich feststellen, daß die gentherapeutisch medierte Sekretion von TIMP-2 durch Hepatozyten sowohl die Zahl als auch die Größe kolorektaler Metastasen im Nacktmausmodell hochsignifikant einschränkt. Dieser Befund war in seiner Eindeutigkeit überraschend und spricht für eine zentrale, nicht ersetzbare Funktion der MMP-2. Da im beschriebenen Ansatz nur etwa 40% der Hepatozyten transduziert waren liegt hier offensichtlich eine hochwirksame Therapie vor, die vermutlich durch lokale hohe Konzentrationen des Wirkstoffs mit antimetastatischer Wirkung auf mehreren Ebenen (Extravasion, Infiltration und Angiogenese) bedingt ist.

In einem zweiten Versuch erfolgte die Applikation der therapeutischen Vektoren eine Woche nach Metastaseninduktion. In diesem Falle war die Therapieeffizienz geringer als bei präventiver Gabe der Vektoren. Die Unterschiede zwischen Behandlungsgruppe (TIMP-2) und Kontrollgruppen (Ad- β gal oder unbehandelt) waren aber hochsignifikant.

g) Die Lebern der Tiere beider experimenteller Ansätze wurden histologisch aufgearbeitet, um sie auf die Standard-Tumorparameter Apoptose und Proliferation sowie das Ausmaß an Angiogenese zu untersuchen.

Zur Bestimmung der Angiogenese, Proliferation und Apoptose wurden Paraffinschritte der Lebern angefertigt und mit den folgenden Antikörpern gefärbt: Zum Nachweis der Angiogenese wurde ein CD31 Antikörper (Daco, Hamburg, Germany) verwendet, zur Bestimmung der Prozentzahl proliferierender Zellen ein MIB-1 (Ki-67) Antikörper (dia 505, Dianova). Der Nachweis erfolgte mittels eines biotinylierten zweiten Antikörpers und eines horse-radish-konjugiertem Avidin (Dako). Zum Nachweis von Apoptose wurde ein ApopTag fluorescein in situ apoptosis Kit (Intergen, Oxford, UK, TUNEL-Methode) verwendet. Deparaffinierte Schnitte wurden mit Proteinase K vorbehandelt. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) wurde zur primären Färbung verwendet und anti-Digoxigenin, konjugiert an Fluorescein, wurde als Reporter Molekül verwendet. Propidiumiodid wurde als Gegenfärbung eingesetzt. Mitosen wurden auf Hematoxylin/Eosin gefärbten Schnitten gezählt. 10 mikroskopische Felder pro Tier wurden bei einer Vergrößerung von x400 (MIB, mitoses, CD31) oder mit einem Ölimmersionsobjektiv (x1000, TUNEL) unter Verwendung eines Zeiss (Axioskop) Fluoreszenzmikroskops (Carl Zeiss, Jena,

Germany) gezählt, und die Mittelwerte wurden errechnet. Die Mittelwerte aller Daten tumortragender Tiere in den einzelnen Behandlungsgruppen wurden errechnet, und zur statistischen Analyse wurde Student's T-Test angewendet.

Es zeigte sich eine signifikant bis hochsignifikant erniedrigte Proliferationsrate und Anzahl an Blutgefäßen und erhöhte Apoptoserate bei Ad-TIMP-2 behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten oder Kontrollvirus behandelten Tieren.

Weitere Ausführungsformen der Erfindung betreffen Vektoren, Promotoren/Enhancer, Transgene, Transmembrananker und Zielorgane

Vektoren

Vor allem beim Vorliegen okkuler Metastasen, deren Reaktivierung erst nach jahrelanger Latenz auftreten kann und bei präoperativer Metastasenprävention ist die Langzeitexpression des transferierten Gens essentiell. Bei Verwendung von Erstgenerations-Adenoviren sind die therapeutischen Effekte zeitlich auf einige Wochen begrenzt. Hierfür werden immunologische Abwehrreaktionen des Empfängers verantwortlich gemacht. Diese scheinen durch die Restexpression adenoviraler Gene bedingt zu sein (Yang, Y. et al. (1994) Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenovirus for gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4407-4411.). Ein vielversprechender Ansatz zur Reduktion der Immunogenität ist die Auslagerung aller kodierenden adenoviralen Genomabschnitte aus dem therapeutischen Vektor (Chen, H.H. et al. (1997) Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1645-1650). Gleichzeitig wird die Transportkapazität solcher Viren erheblich erhöht, so daß mehrere Transgene auf einem Vektor Platz haben, was einen Angriff an verschiedenen Stellen der Metastasierungskaskade möglich macht. Solche TIMP-2 tragenden, sogenannten helper dependent (HD), gutless, oder Minimal-Adenoviren können vermutlich einen langandauernden Schutz vor Organmetastasierung bieten. Weitere Vektoren, die eine länger dauernde Fremdgenexpression zulassen, sind Retroviren und adeno-assoziierte Viren (AAVs). Beide Viren sind nicht immunogen und integrieren notwendigerweise (Retroviren) oder potentiell (AAVs) in das Genom der Wirtszelle. Während bei Retroviren die Notwendigkeit der Replikation der Zielzellen und die Schwierigkeit der Generation hochtitriger Virussuspensionen noch

Probleme bereiten, könnten moderne AAV-Vektoren bereits mittelfristig zum Gentransfer von Proteaseinhibitoren verwendet werden. Aussichtsreiche Vektoren sind außerdem Lentiviren Hybridkonstrukte sowie Herpes Simplex Viren, die eine hohe Affinität zu neuronalem Gewebe haben und daher insbesondere zur Behandlung von Hirnmetastasen und Glioblastomen geeignet sind.

Unter den nicht viralen Vektorsystemen sind Liposomen hervorzuheben.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist die Modifikationen in der Oberflächenstruktur von Viren, die ein Retargeting der Vektoren ermöglicht. Dies wird erreicht in dem ein geeigneter Ligand wird auf viralen spikes exprimiert wird, was eine gezielte Transduktion bestimmter Normalgewebe ermöglicht. So kann man z.B. durch Inkorporation einer Heparindomäne Heparan-exprimierende Zellen gezielt adenoviral transduzieren.

Enhancer/Promotoren

Es können Enhancer/Promotoren verwendet werden, die im jeweiligen zu schützenden Normalgewebe aktiv sind. Hierunter fällt in den meisten Fällen das Organparenchym. In Einzelfällen kann auch eine Expression von Antitumortransgenen durch unterrepräsentierte Zellen des Organs sinnvoll sein, wie z.B. die unten angesprochene Sekretion von Kollagen z.B. durch Fibroblasten.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, Promotoren zu verwenden, die erst nach Zugabe einer körperfremden Substanz aktiviert werden. Mit solchen Promotoren, wie z. B. Tetracyclin abhängigen Promotorelementen oder Steroid responsiven Elementen hat man die Möglichkeit, nur sporadisch zu imprägnieren oder die für eine Metastasierung gefährlichsten Zeitpunkte auszuwählen.

Transgene

1. TIMP-2 ist das geeignete Protein zur Behandlung LS174-Zell abgeleiteter Metastasen. MMP-2, welche durch TIMP-2 gehemmt wird, gehört zu den für die Tumorzellinvasion relevantesten Proteasen. Andere Zelllinien produzieren jedoch auch andere MMPs, und dies spiegelt sich auch im Proteasemuster humaner Tumoren wieder. Auch die extrazelluläre Matrix der Zielorgane ist unterschiedlich

aufgebaut was unterschiedliche Anforderungen an die Tumorzellproteasen stellt. Ein allgemeingültiger Ansatz muß daher auch andere Proteasehemmstoffe als TIMP-2, wie z.B. TIMP-1, PAI-1 oder PAI-2 einbeziehen. Modifikationen in der Struktur der natürlich vorkommenden Inhibitoren führen zu Steigerungen der Wirksamkeit oder zur Verringerung etwaiger Nebenwirkungen. Solche Modifikationen bestehen in Verkürzungen des Moleküls oder in der Veränderung der Sequenz durch Austausch einzelner Basen der DNA. Bespielweise gelingt es durch Entfernung eines endständigen (C-terminalen) Teils des TIMP-2 Moleküls, dessen unerwünschte Protease-aktivierende Funktion zu entfernen.

2. Eine Alternative zur Hemmung der Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) ist die Verstärkung oder Modifikation derselben. Es können hier natürlicherweise vorkommende Komponenten der extrazellulären Matrix überexprimiert werden. Hierunter fallen die Gene für die verschiedenen Kollagene, Fibronectin, Laminin und Gene deren Produkte für die Synthese von nicht proteinischen Komponenten der ECM verantwortlich sind. Weiterhin können Komponenten der ECM, die gewöhnlich nicht in dem betreffenden Organ exprimiert werden, ortsfremd exprimiert werden und damit die Organspezifität von Metastasen verändert werden. Weiterhin können nicht abbaubare oder schwer abbaubare Substanzen, die ein unüberwindliches Hindernis für metastatische Zellen darstellen exprimiert werden.

Ausführungsbeispiel 2:

Es ist seit längerem bekannt, daß in zirrhotischen Lebern seltener Metastasen entstehen, als in normalen Lebern. Ursache hierfür ist vermutlich die Hemmung der Ausbreitung metastatischer Zellen in fibrotischem Gewebe. Diesen Zusammenhang kann man therapeutisch nutzen und erweitern indem hepatisches Normalgewebe durch Gentransfer dazu gebracht wird, seine Mikroanatomie so zu ändern, daß eine Art eingeschränkte künstliche Zirrhose/Fibrose zu generiert wird und damit metastatische Zellen an ihrer Expansion gehindert werden. Kollagen IV ist Hauptbestandteil von Basalmembranen. Eine solche existiert zwischen Hepatozyten und Sinusoïden nicht. Nur wenig kollagenes Gewebe liegt im Disse'schen Raum. Eine geringgradige Erhöhung des Kollagengehaltes wird die Metastasierungsfähigkeit empfindlich einschränken.

Vektorkonstruktion: Die beiden Polypeptidketten, die die Tripelhelix der Kollagenfibrille generieren, werden in einen Minimal-Adenovirus shuttle Vektor kloniert. Als Promotor wird ein tet-Aktivator-responsiver und Doxycyclin-abhängiger Promotor verwendet, um das Ausmaß der Transgenexpression steuerbar zu halten. Außerdem wird der tet-Aktivator mit auf das shuttle Plasmid gebracht. Unter Verwendung eines beliebigen Verpackungssystems wird ein Minimal-Adenovirus hergestellt (=HDAD-tetColl)

Vektortestung: In Nacktmäusen werden durch Injektion von LS 174 Zellen Lebermetastasen induziert. Die Verabreichung von HDAd-tetColl erfolgt in Analogie zur Methodik in Ausführungsbeispiel 1. Gleches gilt für die Auswertung.

3. Ein anderer Weg zur Blockade von Tumorzellinvasion und Motilität ist die Verstärkung der Zell-Zell und Zell-Matrix-Adhäsionen. Zu nennen sind die tight junctions mit den Proteinen Clauadin und Occludin, die Desmosomen und Adherence junctions mit dem Hauptprotein Cadherin, Integrine, die v.a. mit Komponenten der ECM reagieren, die Immunglobulin Superfamilie, die Selectine und die Muzine.

Ausführungsbeispiel 3:

Es wurde bereits gezeigt, daß E-Cadherin für die Interaktion von Epithelzellen verantwortlich ist und ein Verlust von E-Cadherin durch Zellen im Primärtumor Metastasierung fördert (Birchmeier, W. (1995) E-cadherin as a tumor (invasion) suppressor gene. Bioessays 17, 97-99). Eine Expression von E-Cadherin durch Normalzellen führt einerseits zu einer Adhesion mit den Tumorzellen und zu einer Hemung von deren Motilität und weiterhin zu einer Verstärkung der Adhesion innerhalb der Normalzellen.

Vektorkonstruktion: Ein Erstgenerations-Adenovirus wird konsruiert, welches das E-Cadherin-Gen unter der Kontrolle des RSV-Promotors trägt: Ad-RSV-E-Cad.

In vitro Testung: Zur Funktionstestung werden A2 Zellen mit Ad-RSV-E-Cad transduziert. Eine Zunahme der Adhesion wird durch Bestimmung der Zeitdauer ermittelt, die Trypsin benötigt, um die Zellen zu vereinzeln.

Vektortestung :In Nacktmäusen werden durch Injektion von LS 174 Zellen Lebermetastasen induziert. Die Verabreichung von Ad-RSV-E-Cad erfolgt in Analogie zur Methodik in Ausführungsbeispiel 1. Gleches gilt für die Auswertung.

Transgene mit Membranankersequenz

Suizidgene werden im Sinne der Erfindung zur Imprägnierung von Normalgewebe verwendet, dazu müssen sie mit einer Membranankersequenz ausgestattet werden, um extrazellulär wirksam zu sein und eine applizierte Prodrug auch extrazellulär toxifizieren zu können.

Ausführungsbeispiel 4:

Das Gen für das Suizidgen Cytosin Desaminase unter der Kontrolle des HNFAlbumin-Promotors wird mit einer Membranankersequenz versehen, so daß es nach Transfektion membranständig exprimiert wird. Diese Expressionskassette wird in einen AAV-shuttle Plasmid kloniert und ein AAV wird unter Verwendung eines beliebigen Helpersonsystems hergestellt (=AAV-HNFAlb-CD-Tm).

In vitro Testung: A2 Zellen werden mit AAV-HNFAlb-CD-Tm transduziert. 24 h nach Transduktion wird die Prodrug 5-FC in den Zellkulturüberstand (ZKÜ) gegeben. 5-FC wird nun durch die membranständige CD in das zytotoxische 5-FU überführt. Der Überstand wird nach 24 h gesammelt und auf die Zelllinie LS174 sowie auf ruhende primäre Hepatozyten gegeben. Nach weiteren 72h werden Zellzählungen vorgenommen, und das Ausmaß der Apoptose wird bestimmt.

In vivo Testung: Vektorapplikation und Ermittlung der Therapieeffizienz verlaufen in Analogie zum Ausführungsbeispiel 1.

Zielorgane

Auf Grund der hervorragenden Infizierbarkeit der Leber bei systemischer Gabe von Adenoviren und der hohen klinischen Relevanz der Behandlung kolorektaler Metastasen wurde das erfindungsgemäße Verfahren an Hand des oben beschriebenen Krankheitsmodells entwickelt. Das Modell läßt sich auch auf andere Tumorerkrankungen anwenden. Zu den häufigsten Krankheitsbildern gehören Leber-, Lungen-, Knochen- und Hirnmetastasen bei Mammakarzinom mit Latenzzeiten bis zu 10 Jahren nach Entfernung des Primärtumors, ein Zeitraum, der bisher ungenutzt verstreicht, Hirnmetastasen bei Bronchialkarzinom und Knochenmetastasen bei Prostatakarzinom.

Weiterhin gibt es Primärtumoren, die aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums primär inoperabel sind, wie häufig Glioblastome und Hepatozelluläre Karzinome. Als lebensverlängernde Maßnahme ist hier der Schutz des umgebenden Normalgewebes nach oben genanntem Prinzip vorstellbar.

Legende zu den Abbildungen:

Abbildung 1: Verhinderung von Lebermetastasierung durch systemische Applikation von Ad-TIMP-2. An Tag 0 wurden 3×10^{10} pfu Ad-TIMP-2 oder Ad- β gal in die Schwanzvene von Nacktmäusen appliziert. 3 Tage später erhielten die Tiere eine intrasplenale Injektion von LS174 Kolonkarzinomzellen zur Induktion von Lebermetastasen. Representative in situ Photographien von unbehandelten (links), Ad- β gal behandelten (Mitte) und Ad-TIMP-2 behandelten (rechts) Tieren nach 5 Wochen.

Abbildung 2: Methodik wie Abbildung 1. Nach 5 Wochen wurden die Tiere getötet und die Tumormassen wurden bestimmt. Punkte entsprechen einzelnen Tieren, Balken entsprechen den Mittelwerten.

Patentansprüche

1. Mittel zur gentherapeutischen Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen umfassend einen

- Vektor im Sinne eines Gentransfervehikels
- Enhancer/Promotor
- Transgen

wobei mindestens einer der aufgeführten Bestandteile auf die Imprägnierung von Normalgewebe ausgerichtet ist.

2. Anwendung des Mittels nach Anspruch 1 zur gentherapeutischen Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen umfassend einen

- Vektor im Sinne eines Gentransfervehikels
- Enhancer/Promotor
- Transgen

wobei mindestens einer der aufgeführten Bestandteile auf die Imprägnierung von Normalgewebe ausgerichtet ist.

3. Anwendung eines Gentransfervektors umfassend ein Transgen in operativer Verknüpfung mit einem Enhancer/Promotor zur Herstellung eines Mittels für die gentherapeutische Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen durch Verabreichung an Normalgewebe.

4. Verfahren zur gentherapeutischen Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel umfassend einen

- Vektor im Sinne eines Gentransfervehikels
- Enhancer/Promotor
- Transgen

wobei mindestens einer der aufgeführten Bestandteile auf die Imprägnierung von Normalgewebe ausgerichtet ist, einem Subjekt, welches einer prophylaktischen oder therapeutischen Tumorbehandlung bedarf, derart verabreicht, daß der Vektor im Wesentlichen von Normalzellen aufgenommen wird.

5. Mittel nach Anspruch 1, mit einem Promotor und/oder Enhancer, der durch Transkriptionsfaktoren reguliert wird, die in Normalgewebe aktiv sind.

6. Mittel nach Anspruch 5 enthaltend

den CMV-Promotor oder den SV 40 Promotor oder den RSV Promotor, oder leberspezifische Promotoren, wie den Albumin Promotor oder lungenspezifische Promotoren oder hirngewebsspezifische Promotoren oder knochenspezifische Promotoren oder Promotoren, die in potentiellen metastatischen Zielorganen oder Organen des Entstehens von Primärtumoren aktiv sind.

7. Mittel nach Anspruch 5 enthaltend

einen Enhancer/Promotor der durch Zugabe einer applizierbaren Substanz aktiviert wird.

8. Mittel nach Anspruch 5 und 7 bei dem es sich um einen Tetracyclin abhängigen oder einen Steroidhormon abhängigen Promotor handelt.

9. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend Transgene für Substanzen,

- welche das Wachstum des Tumors begrenzen
- den Tumor zerstören
- das Normalgewebe vor Tumorinvasion schützen.

10. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend Gene von Metalloproteaseinhibitoren

11. Mittel nach Anspruch 1 und 10 enthaltend ein antitumorales Transgen kodierend für:

TIMP-1 oder TIMP-2

12. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Protease-inhibitorisches Transgen kodierend für:

TIMP-3 oder TIMP-4 oder PAI-1 oder PAI-2.

13. Mittel nach Anspruch 11 oder 12 enthaltend ein modifiziertes Transgen, dessen antitumorale Wirkung durch diese Modifikation verstärkt wurde.

14. Mittel nach Anspruch 13 welches als betreffendes Transgen C-terminal trunkierte TIMP-2 enthält.
15. Mittel nach Anspruch 1, 2 oder 3 enthaltend ein Transgen der Extrazellulären Matrix.
16. Mittel nach Anspruch 15 enthaltend mindestens zwei Polypeptidketten des Kollagen oder Fibronectin oder Laminin oder Gene deren Produkte für die Synthese von nicht proteinischen Komponenten der ECM verantwortlich sind.
17. Mittel nach Anspruch 15 oder 16 enthaltend ein so modifiziertes Transgen der Extrazellulären Matrix, daß es schwer oder nicht abbaubar ist.
18. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Transgen kodierend für ein Adhäisionsmolekül.
19. Mittel nach Anspruch 18 in dem das betreffende Adhäisionsmolekül das Claudin oder Occludin oder ein Cadherin oder ein Integrin oder ein Gen aus der Immunglobulin Superfamilie ein Selectin oder ein Muzin ist.
20. Mittel zur Prophylaxe und Behandlung von Tumorerkrankungen enthaltend ein antitumorales Transgen oder Sequenzen desselben, welches mit einer Membranankersequenz versehen ist.
21. Anwendung eines Gentransfervektors zur Herstellung eines Mittels zur Prophylaxe und Behandlung von Tumorerkrankungen enthaltend ein antitumorales Transgen oder Sequenzen desselben, welches mit einer Membranankersequenz versehen ist.
22. Verfahren zur Prophylaxe und Behandlung von Tumorerkrankungen bei dem ein antitumorales Transgen oder Sequenzen desselben, welches mit einer Membranankersequenz versehen ist transferiert wird.

23. Mittel nach Anspruch 20 welches als betreffendes Transgen ein Suizidgen oder ein sonstwie chemotherapeutisch wirksames Gen enthält
24. Mittel nach Anspruch 23 in dem das betreffende Transgen Cytosin Desaminase oder aktive Teilsequenzen derselben oder Nitroreduktase oder aktive Teilsequenzen derselben sind.
25. Mittel nach Anspruch 1 in dem der Vektor ein Virus ist.
26. Mittel nach Anspruch 25 in dem das Virus ein Erstgenerations-Adenovirus oder ein Adeno-assoziiertes Virus oder ein Minimal-Adenovirus oder ein HSV oder ein Lentivirus ist.
27. Mittel nach Anspruch 26 in dem das Virus ein Lentivirus/Minimal-Adenovirus Hybrid ist.
28. Mittel nach Anspruch 27 in dem der Vektor ein nicht-humane Mammalier-Adenovirus ist.
29. Mittel nach Anspruch 1 in dem der Vektor kein Virus ist.
30. Mittel nach Anspruch 29 in dem der Vektor eine liposomale Formulation ist oder Trägerproteine verwendet sind.
31. Mittel nach Anspruch 25 und 29, in dem die Oberfläche so modifiziert ist, daß ein spezifischer Gentransfer in das Normalgewebe erreicht wird.
32. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Minimal-Adenovirus und TIMP-2.
33. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Minimal-Adenovirus und C-terminal trunkiertes TIMP-2.
34. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein AAV und TIMP-2

35. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Erstgenerations-Adenovirus und TIMP-2.
36. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Lentivirus/Minimaladenovirus Hybrid und TIMP-2.
37. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein AAV und C-terminal trunkiertes TIMP-2.
38. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Minimal-Adenovirus und E-Cadherin.
39. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein AAV und E-Cadherin.
40. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Minimal-Adenovirus und mindestens zwei Polypeptidketten des Kollagen.
41. Mittel nach Anspruch 1 zum Gentransfer ins Lebergewebe.
42. Mittel nach Anspruch 1 zur Therapie und Prophylaxe von Lebermetastasen.
43. Mittel nach Anspruch 1 zur Therapie von Hirntumoren.
44. Mittel nach Anspruch 1 zur Therapie von Lungenmetastasen.
45. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend den HNFAlbumin-Enhancer/Promotor, AAV und TIMP-1.
46. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend einen Enhancer/Promotor, der durch eine körperfremde Substanz aktiviert wird und mindestens zwei Polypeptidketten des Kollagen.
47. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend einen leberspezifischen Promotor, ein AAV und einen Metalloprotease-Inhibitor.
48. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend einen leberspezifischen Promotor, ein Minimal-Adenovirus und einen Metalloprotease-Inhibitor.

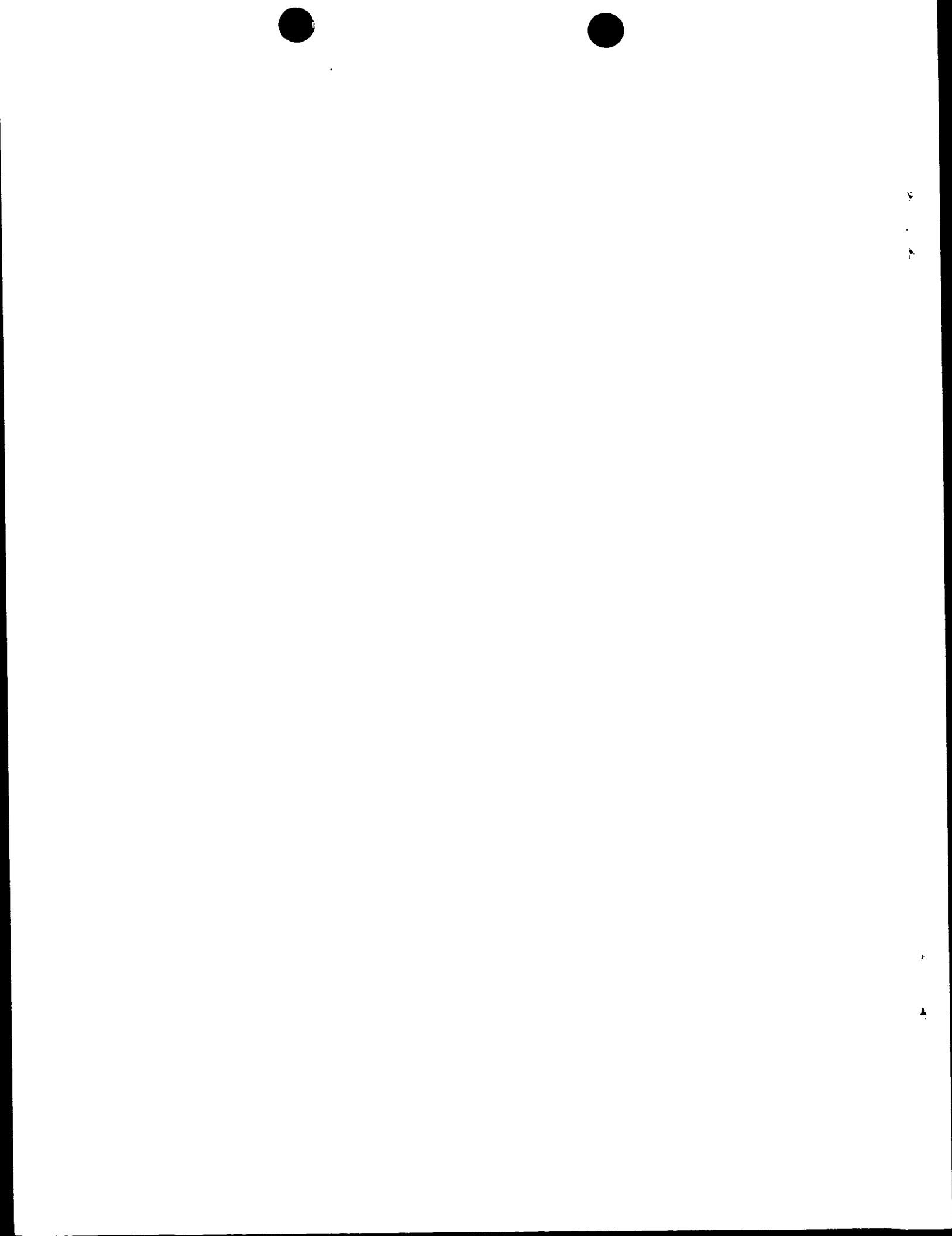
49. Mittel nach Anspruch 1 und 9 enthaltend einen leberspezifischen Promotor und ein Minimal-Adenovirus.

50. Mittel nach Anspruch 1 und 9 enthaltend einen leberspezifischen Promotor und ein AAV.

51. Mittel nach Anspruch 1 und 9 enthaltend einen leberspezifischen Promotor und ein Lentivirus/Minimal-Adenovirus Hybrid.



Abb. 1



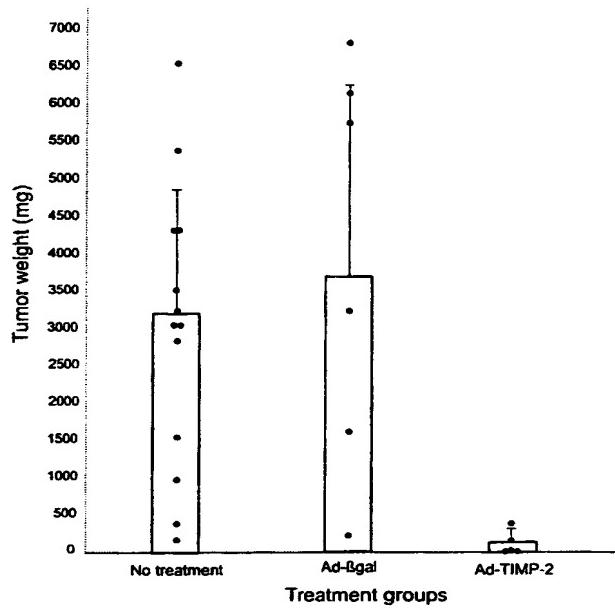
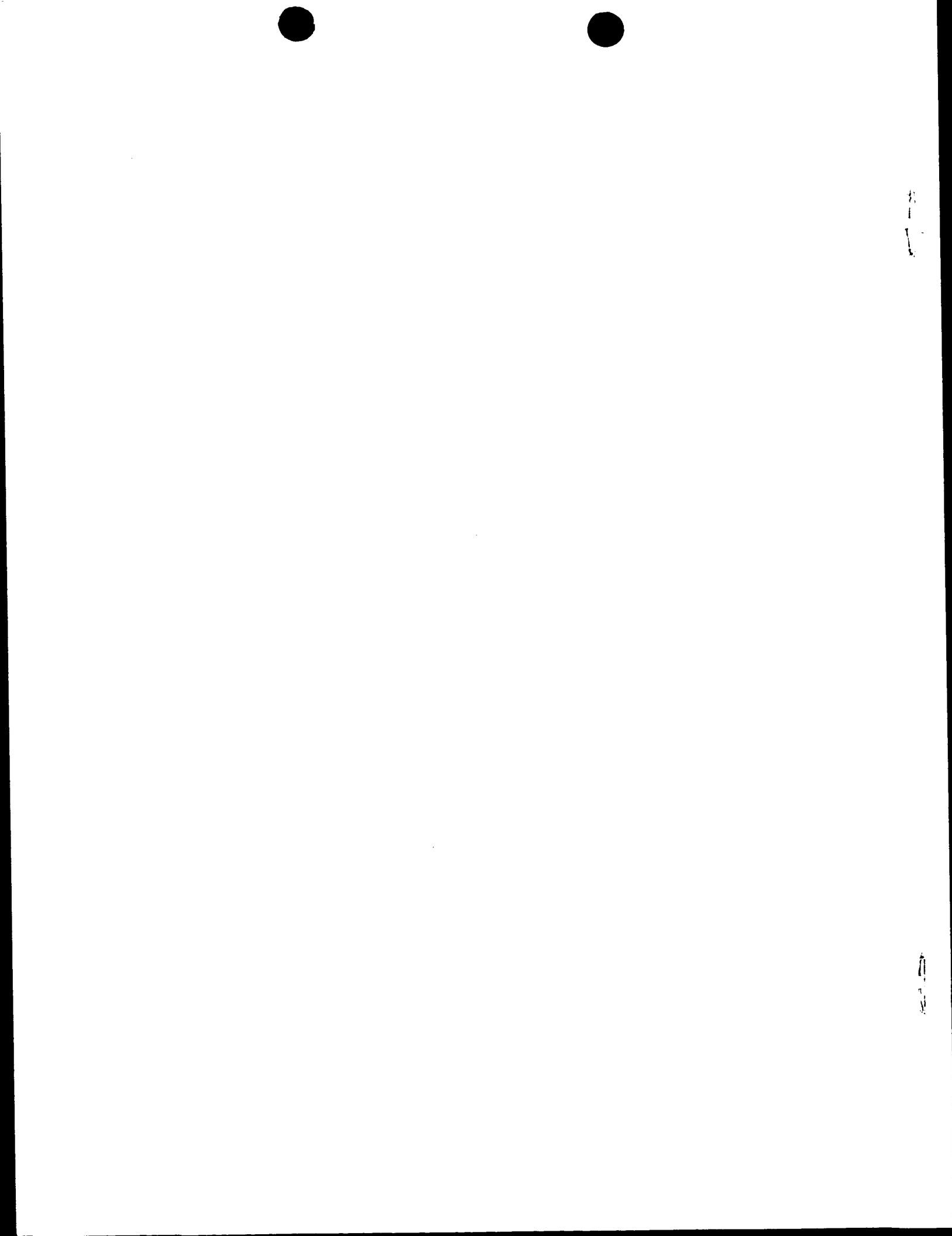


Abb. 2



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. November 2000 (09.11.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/66176 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 48/00, (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, A61P 35/04 AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01416
- (22) Internationales Anmeldedatum:
2. Mai 2000 (02.05.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:
199 19 865.9 30. April 1999 (30.04.1999) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: BRAND, Karsten [DE/DE]; Jagowstrasse 30,
D-10555 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BAKER, Andrew
[DE/DE]; Hillview, 24 Round Riding Road, Dumbarton
G82 2HW (DE). STRAUSS, Michael [DE/DE]; Charlottenstrasse 17, D-13156 Berlin (DE).
- (74) Anwalt: BAUMBACH, F.; Robert-Rössle-Strasse 10,
D-13125 Berlin (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 29. März 2001

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

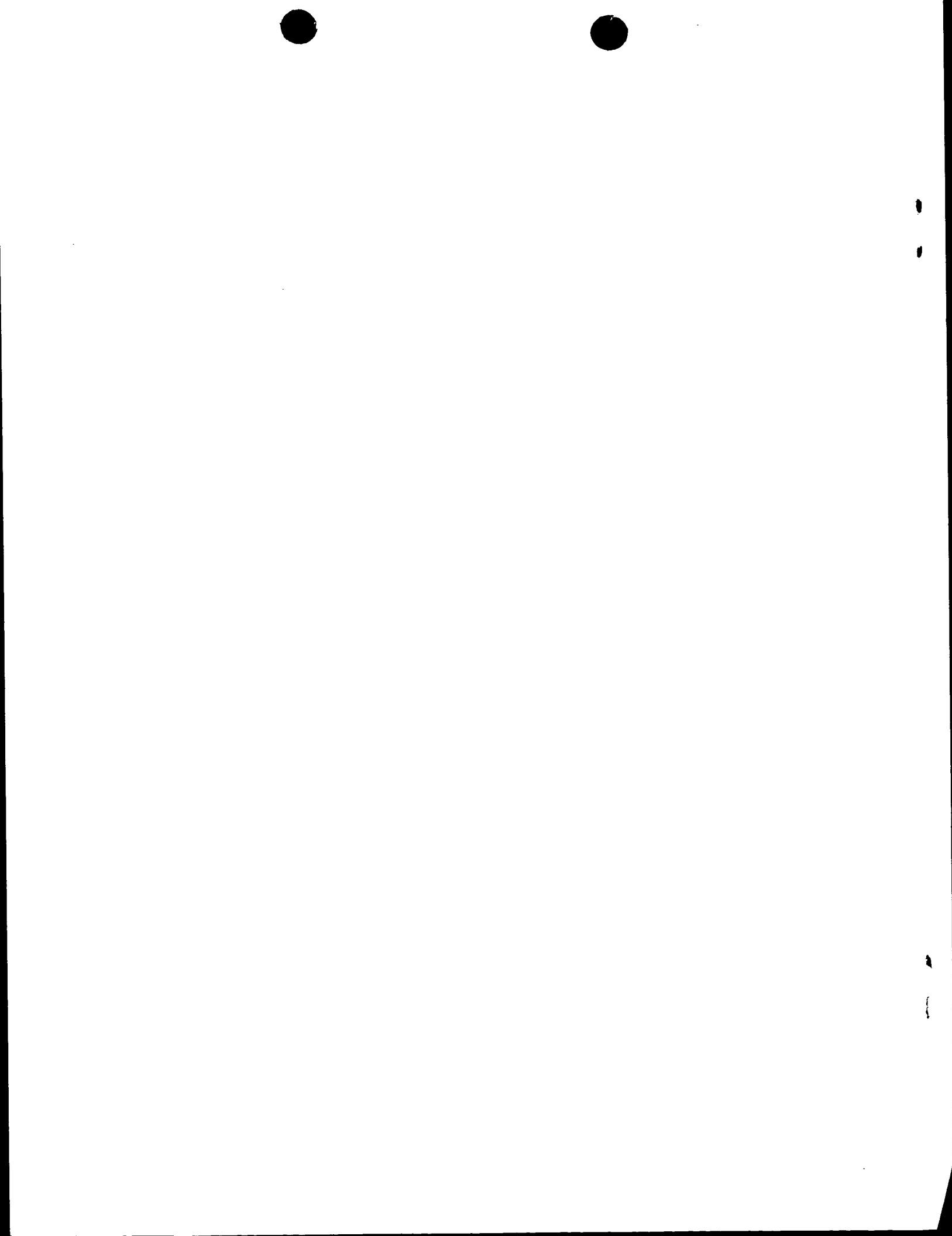
(54) Title: AGENT FOR GENE THERAPY AND FOR THE PREVENTION OF METASTASES, AS WELL AS FOR THE GENE
THERAPY OF TUMORS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR GENTHERAPIE UND ZUR PRÄVENTION VON METASTASEN BZW. ZUR GENTHERA-
PIE VON TUMOREN

WO 00/66176 A3

(57) Abstract: The invention relates to an agent for the prophylaxis and treatment of primary tumors and metastases. The invention relates in particular to a gene therapy vector and a DNA sequence with an enhancer/promotor component and a transgene. The individual components of the agent are chosen such that they impregnate the normal tissue of potentially or already affected organs against invasive tumor cells. This prevents the formation of metastatic sites, induces the shrinkage of existing sites or limits the invasion of primary tumors.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Prophylaxe und Therapie von Primärtumoren und Metastasen. Die essentiellen Komponenten der Erfindung betreffen einen gentherapeutischen Vektor und eine DNA-Sequenz mit Enhancer/Promotor-Komponente und Transgen. Die einzelnen Komponenten des Mittels sind so ausgewählt, daß sie eine Imprägnierung des Normalgewebes potentiell oder bereits betroffener Organe gegenüber invasiven Tumorzellen gewährleisten, was die Entstehung metastatischer Herde verhindert, die Rückbildung bestehender Herde induziert oder die Invasion von Primärtumoren begrenzt.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 00/01416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K48/00 A61P35/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X | <p>MARAIS R. ET AL: "A cell surface tethered enzyme improves efficiency in gene-directed enzyme prodrug therapy" NATURE BIOTECHNOLOGY, (1997), 15/13 (1373-1377), 32 REFERENCE(S) CODEN: NABIFO ISSN: 1087-0156, XP002151679</p> <p>C.J. Springer, CRC Centre for Cancer Therapeutics, Institute of Cancer Research, Cotswold Rd., Sutton, Surrey SM2 5NG, United Kingdom. E-mail: caroline@icr.ac.uk the whole document</p> <p>---</p> | 1-9, 20-24 |
| X | <p>WO 96 03515 A (SPRINGER CAROLINE JOY ; MARAIS RICHARD (GB); CANCER RES CAMPAIGN TE) 8 February 1996 (1996-02-08)</p> <p>the whole document</p> <p>---</p> <p>---</p> | 1-9, 20-24 |
| | | -/- |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
| 9 November 2000 | 28/11/2000 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Niemann, F |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/DE 00/01416

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------------|
| X | BOEDEKER B ET AL: "Design of transmembrane suicide fusion genes for genetic manipulation of T-cells." BLOOD, vol. 86, no. 10 SUPPL. 1, 1995, page 995A XP000953303 37th Annual Meeting of the American Society of Hematology; Seattle, Washington, USA; December 1-5, 1995 ISSN: 0006-4971 the whole document --- | 1-9, 20-24 |
| X | BLEZINGER P ET AL: "Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene." NATURE BIOTECHNOLOGY, (1999 APR) 17 (4) 343-8. XP002151680 the whole document --- | 1-9, 29, 30, 41-44 |
| X | DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 10 February 1999 (1999-02-10) SCHULTZ JAN ET AL: "Long-lasting anti-metastatic efficiency of interleukin 12-encoding plasmid DNA." Database accession no. PREV199900145697 XP002151681 abstract & HUMAN GENE THERAPY, vol. 10, no. 3, 10 February 1999 (1999-02-10), pages 407-417, ISSN: 1043-0342 --- | 1-9, 29, 30, 41-44 |
| X | LI H ET AL: "Adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice." GENE THERAPY, vol. 5, no. 8, August 1998 (1998-08), pages 1105-1113, XP000953414 ISSN: 0969-7128 the whole document --- | 1-9, 25-28, 31, 41-44 |
| X | HUANG Y W ET AL: "Adhesion molecules as targets for cancer therapy." HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, (1997 APR) 12 (2) 467-77. REF: 119 XP000953300 the whole document --- | 1-9, 18, 19, 38, 39 |
| | | -/- |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Interr. Nat Application No
PCT/DE 00/01416

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------------|
| Category ° | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | KAWAMATA H. ET AL: "Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1995) 63/5 (680-687). , XP000953304 the whole document ---- | 1-14, 32-37, 45,47-51 |
| X | US 5 731 192 A (REEDERS STEPHEN T ET AL) 24 March 1998 (1998-03-24) the whole document ---- | 1,15-17, 40,46 |
| A | AHMAD A ET AL: "Mechanisms of metastasis." CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY-HEMATOLOGY, vol. 26, no. 3, December 1997 (1997-12), pages 163-173, XP000953342 ISSN: 1040-8428 the whole document ---- | 10-19, 32-48 |
| A | GOSSEN M ET AL: "TIGHT CONTROL OF GENE EXPRESSION IN MAMMALIAN CELLS BY TETRACYCLINE-RESPONSIVE PROMOTERS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 89, no. 12, 15 June 1992 (1992-06-15), pages 5547-5551, XP000564458 ISSN: 0027-8424 the whole document ---- | 7,8 |
| A | XIAO W ET AL: "Adeno - associated virus as a vector for liver-directed gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, US, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 72, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 10222-10226, XP002125023 ISSN: 0022-538X the whole document ---- | 47-51 |
| A | WO 97 04117 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; SANDIG VOLKER (DE); LOESER PETER (DE); ST) 6 February 1997 (1997-02-06) the whole document ---- | 47-51 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Initial Application No

PCT/DE 00/01416

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|---|------------------|---|--|
| WO 9603515 | A | 08-02-1996 | AT 188256 T AU 693584 B AU 3119095 A AU 712383 B AU 3119195 A CA 2196051 A CA 2196052 A DE 69514234 D DE 69514234 T DK 774005 T EP 0774005 A EP 0772455 A EP 0919622 A ES 2143641 T WO 9603151 A GR 3032744 T JP 10503646 T JP 10505335 T NZ 290448 A NZ 290449 A PT 774005 T US 6004550 A US 6025340 A ZA 9506263 A ZA 9506264 A | 15-01-2000 02-07-1998 22-02-1996 04-11-1999 22-02-1996 08-02-1996 08-02-1996 03-02-2000 13-07-2000 22-05-2000 21-05-1997 14-05-1997 02-06-1999 16-05-2000 08-02-1996 30-06-2000 07-04-1998 26-05-1998 26-01-1998 26-08-1998 30-06-2000 21-12-1999 15-02-2000 22-05-1996 15-03-1996 |
| US 5731192 | A | 24-03-1998 | NONE | |
| WO 9704117 | A | 06-02-1997 | DE 19525900 C AT 189481 T CA 2226926 A DE 59604375 D EP 0839205 A ES 2146404 T JP 11509412 T US 6025195 A | 12-12-1996 15-02-2000 06-02-1997 09-03-2000 06-05-1998 01-08-2000 24-08-1999 15-02-2000 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 00/01416

A. KLASSEFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K48/00 A61P35/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | MARAIS R. ET AL: "A cell surface tethered enzyme improves efficiency in gene-directed enzyme prodrug therapy" NATURE BIOTECHNOLOGY, (1997), 15/13 (1373-1377), 32 REFERENCE(S) CODEN: NABIFO ISSN: 1087-0156, XP002151679 C.J. Springer, CRC Centre for Cancer Therapeutics, Institute of Cancer Research, Cotswold Rd., Sutton, Surrey SM2 5NG, United Kingdom. E-mail: caroline@icr.ac.uk das ganze Dokument | 1-9, 20-24 |
| X | WO 96 03515 A (SPRINGER CAROLINE JOY ;MARAIS RICHARD (GB); CANCER RES CAMPAIGN TE) 8. Februar 1996 (1996-02-08) das ganze Dokument | 1-9, 20-24 |
| | | -/- |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

| | |
|---|---|
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts |
| 9. November 2000 | 28/11/2000 |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Niemann, F |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. nales Aktenzeichen
PCT/DE 00/01416

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|-----------------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | <p>BOEDEKER B ET AL: "Design of transmembrane suicide fusion genes for genetic manipulation of T-cells." BLOOD, Bd. 86, Nr. 10 SUPPL. 1, 1995, Seite 995A XP000953303 37th Annual Meeting of the American Society of Hematology; Seattle, Washington, USA; December 1-5, 1995 ISSN: 0006-4971 das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-9, 20-24 |
| X | <p>BLEZINGER P ET AL: "Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene." NATURE BIOTECHNOLOGY, (1999 APR) 17 (4) 343-8. XP002151680 das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-9, 29, 30, 41-44 |
| X | <p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 10. Februar 1999 (1999-02-10)</p> <p>SCHULTZ JAN ET AL: "Long-lasting anti-metastatic efficiency of interleukin 12-encoding plasmid DNA." Database accession no. PREV199900145697 XP002151681 Zusammenfassung & HUMAN GENE THERAPY, Bd. 10, Nr. 3, 10. Februar 1999 (1999-02-10), Seiten 407-417, ISSN: 1043-0342</p> <p>---</p> | 1-9, 29, 30, 41-44 |
| X | <p>LI H ET AL: "Adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice." GENE THERAPY, Bd. 5, Nr. 8, August 1998 (1998-08), Seiten 1105-1113, XP000953414 ISSN: 0969-7128 das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-9, 25-28, 31, 41-44 |
| X | <p>HUANG Y W ET AL: "Adhesion molecules as targets for cancer therapy." HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, (1997 APR) 12 (2) 467-77. REF: 119 , XP000953300 das ganze Dokument</p> <p>---</p> | 1-9, 18, 19, 38, 39 |
| | | -/- |

INTERNATIONALER FORSCHENBERICHT

| | |
|-----------------|-------------------|
| Intern | ales Aktenzeichen |
| PCT/DE 00/01416 | |

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|------------------------------|
| X | KAWAMATA H. ET AL: "Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1995) 63/5 (680-687). , XP000953304 das ganze Dokument --- | 1-14, 32-37, 45, 47-51 |
| X | US 5 731 192 A (REEDERS STEPHEN T ET AL) 24. März 1998 (1998-03-24) das ganze Dokument --- | 1, 15-17, 40, 46 |
| A | AHMAD A ET AL: "Mechanisms of metastasis." CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY-HEMATOLOGY, Bd. 26, Nr. 3, Dezember 1997 (1997-12), Seiten 163-173, XP000953342 ISSN: 1040-8428 das ganze Dokument --- | 10-19, 32-48 |
| A | GOSEN M ET AL: "TIGHT CONTROL OF GENE EXPRESSION IN MAMMALIAN CELLS BY TETRACYCLINE-RESPONSIVE PROMOTERS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 89, Nr. 12, 15. Juni 1992 (1992-06-15), Seiten 5547-5551, XP000564458 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument --- | 7, 8 |
| A | XIAO W ET AL: "Adeno - associated virus as a vector for liver-directed gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, US, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, Bd. 72, Nr. 12, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 10222-10226, XP002125023 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument --- | 47-51 |
| A | WO 97 04117 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ; SANDIG VOLKER (DE); LOESER PETER (DE); ST) 6. Februar 1997 (1997-02-06) das ganze Dokument --- | 47-51 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. als Aktenzeichen

PCT/DE 00/01416

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|----------------------------|---|--|
| WO 9603515 A | 08-02-1996 | AT 188256 T AU 693584 B AU 3119095 A AU 712383 B AU 3119195 A CA 2196051 A CA 2196052 A DE 69514234 D DE 69514234 T DK 774005 T EP 0774005 A EP 0772455 A EP 0919622 A ES 2143641 T WO 9603151 A GR 3032744 T JP 10503646 T JP 10505335 T NZ 290448 A NZ 290449 A PT 774005 T US 6004550 A US 6025340 A ZA 9506263 A ZA 9506264 A | 15-01-2000 02-07-1998 22-02-1996 04-11-1999 22-02-1996 08-02-1996 08-02-1996 03-02-2000 13-07-2000 22-05-2000 21-05-1997 14-05-1997 02-06-1999 16-05-2000 08-02-1996 30-06-2000 07-04-1998 26-05-1998 26-01-1998 26-08-1998 30-06-2000 21-12-1999 15-02-2000 22-05-1996 15-03-1996 |
| US 5731192 A | 24-03-1998 | KEINE | |
| WO 9704117 A | 06-02-1997 | DE 19525900 C AT 189481 T CA 2226926 A DE 59604375 D EP 0839205 A ES 2146404 T JP 11509412 T US 6025195 A | 12-12-1996 15-02-2000 06-02-1997 09-03-2000 06-05-1998 01-08-2000 24-08-1999 15-02-2000 |

09/980972

M-5

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

BERICHTIGTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. November 2000 (09.11.2000)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/066176 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **A61K 48/00,**
A61P 35/04

DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ,
PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,
TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/01416

PCT

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. Mai 2000 (02.05.2000)

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches
Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches
Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

DE

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

(30) Angaben zur Priorität:
199 19 865.9 30. April 1999 (30.04.1999) DE

(71) Anmelder und
(72) Erfinder: BRAND, Karsten [DE/DE]; Jagowstrasse 30,
D-10555 Berlin (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 29. März 2001

(72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BAKER, Andrew
[DE/DE]; Hillview, 24 Round Riding Road, Dumbarton
G82 2HW (DE). STRAUSS, Michael [DE/DE]; Charlottenstrasse 17, D-13156 Berlin (DE).

(48) Datum der Veröffentlichung dieser berichtigten
Fassung: 12. September 2002

(74) Anwalt: BAUMBACH, E.; Robert-Rössle-Strasse 10,
D-13125 Berlin (DE).

(15) Informationen zur Berichtigung:
siehe PCT Gazette Nr. 37/2002 vom 12. September 2002,
Section II

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

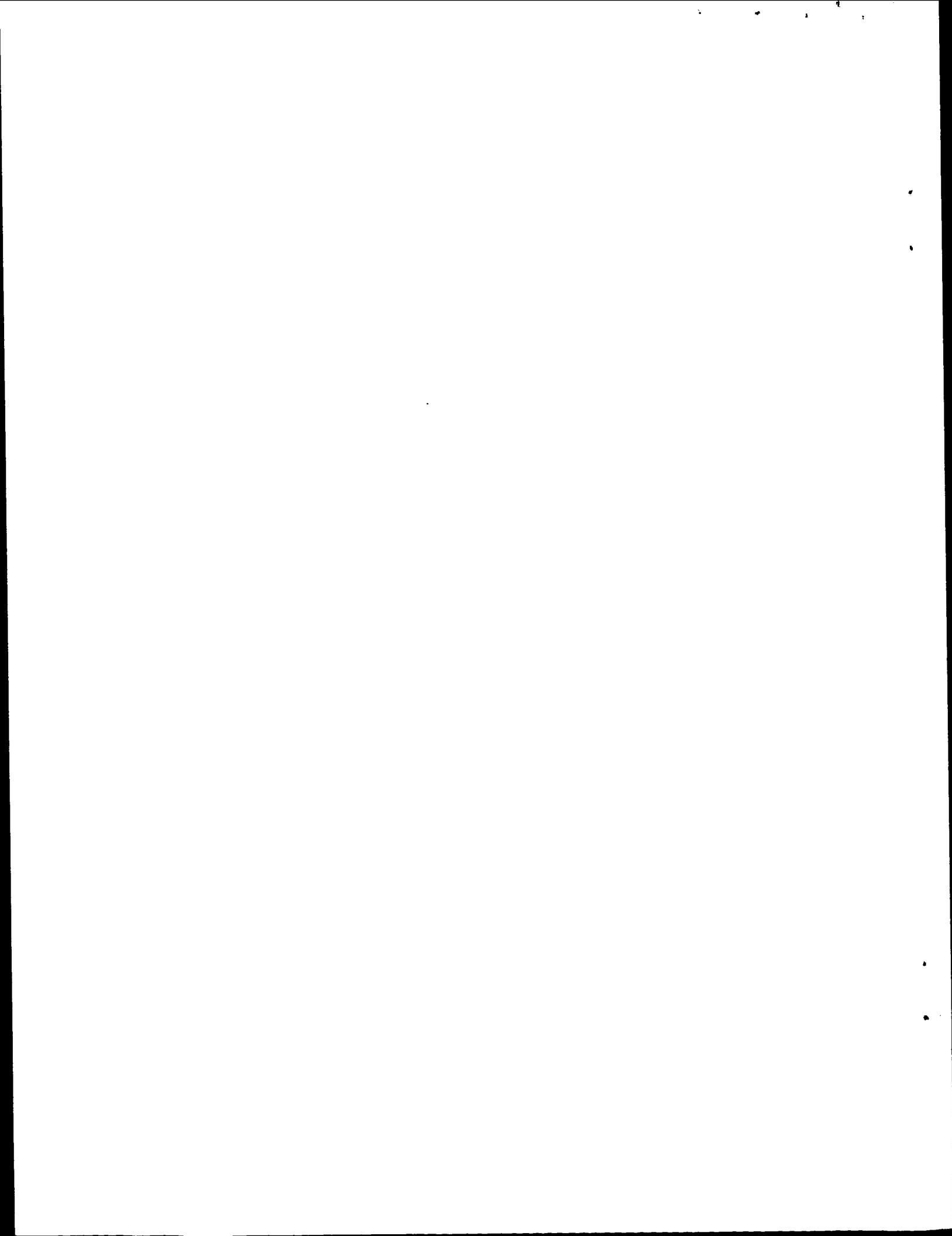
(54) Title: AGENT FOR GENE THERAPY AND FOR THE PREVENTION OF METASTASES, AS WELL AS FOR THE GENE
THERAPY OF TUMORS

(54) Bezeichnung: MITTEL ZUR GENTHERAPIE UND ZUR PRÄVENTION VON METASTASEN BZW. ZUR GENTHERA-
PIE VON TUMOREN

(57) Abstract: The invention relates to an agent for the prophylaxis and treatment of primary tumors and metastases. The invention relates in particular to a gene therapy vector and a DNA sequence with an enhancer/promotor component and a transgene. The individual components of the agent are chosen such that they impregnate the normal tissue of potentially or already affected organs against invasive tumor cells. This prevents the formation of metastatic sites, induces the shrinkage of existing sites or limits the invasion of primary tumors.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft die Prophylaxe und Therapie von Primärtumoren und Metastasen. Die essentiellen Komponenten der Erfindung betreffen einen gentherapeutischen Vektor und eine DNA-Sequenz mit Enhancer/Promotor-Komponente und Transgen. Die einzelnen Komponenten des Mittels sind so ausgewählt, daß sie eine Imprägnierung des Normalgewebes potentiell oder bereits betroffener Organe gegenüber invasiven Tumorzellen gewährleisten, was die Entstehung metastatischer Herde verhindert, die Rückbildung bestehender Herde induziert oder die Invasion von Primärtumoren begrenzt.

WO 00/066176 A3



Mittel zur Gentherapie und zur Prävention von Metastasen bzw. zur Gentherapie von Tumoren**Beschreibung**

Die bei weitem häufigste Todesursache maligner Tumorerkrankungen ist die Organmetastasierung. Während der Primärtumor zumindest in frühen und mittleren Stadien chirurgisch reseziert werden kann, ist dies im Fall der Metastasierung selten möglich. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, können die konventionellen Methoden der Chemotherapie und Bestrahlung, wenn überhaupt, dann nur vorübergehende Besserungen des klinischen Bildes metastasierter Tumoren erreichen.

Zu den häufigsten Tumoren gehören kolorektale Karzinome. Lebermetastasen kolorektalen Ursprungs sind die häufigste Todesursache für Patienten mit kolorektalen Karzinomen. Da sie nach chirurgischer Entfernung des Primärtumors häufig über einen längeren Zeitraum die einzige Manifestation der Erkrankung darstellen, sind sie ein mögliches Ziel für kurative Therapieansätze (Dreben, JA and Niederhuber, JE. (1993) Cancer of the lower gastrointestinal tract - Colon cancer. In: Niederhuber, JE ed. Current Therapy in Oncology. St. Louis, MO: Decker, 426-431). Die potentiell kurative chirurgische Entfernung von Lebermetastasen ist aber nur für einen kleinen Prozentsatz der Patienten möglich und für die Chemotherapie sind zwar vorübergehende Remissionen aber keine Lebensverlängerung gezeigt. Daher besteht dringender Bedarf nach alternativen Therapieformen.

Die seit etwa 10 Jahren in der Entwicklung befindlichen gentherapeutischen Ansätze besitzen aufgrund ihrer Komplexität ein gegenüber konventionellen Therapieformen dramatisch erhöhtes Maß an Regulierbarkeit. Diese kann im Bereich der Krebsgentherapie unter anderem zum tumorspezifischen Targeting der Vektoren oder der Beschränkung der Genexpression auf Tumorgewebe und zur spezifischen Adaptation der transferierten Transgene an Angriffspunkte des jeweiligen Tumortyps genutzt werden.

Abgesehen von immunologischen Herangehensweisen, haben die bisher verfolgten gentherapeutischen Ansätze, wie schon die konventionellen Methoden, fast ausschließlich das infiltrierende Tumorgewebe zum primären Angriffspunkt. Dies

birgt die Problematik unzureichenden Erreichens des Tumors, welcher sich mit erhöhtem intratumoralem Druck und eingeschränkter Blutversorgung präsentiert und selbst bei der üblicherweise durchgeführten direkten intratumoralen Injektion gentherapeutischer Transfervehikel nur ungenügend getroffen wird. Im Falle multipler Metastasierung hat sich gezeigt, daß sich bei der dann erforderlichen systemischen oder regionalen Gabe der Vektoren das umgebende Normalgewebe sogar wesentlich besser infizieren läßt als die Tumorzellen.

Die Erfindung hat das Ziel, die Prophylaxe und die Therapie von Tumormetastasen und Primärtumoren zu verbessern.

Die Erfindung wird gemäß den Ansprüchen realisiert. Die gemäß der Erfindung entwickelte Strategie umgeht die Problematik der schwierigen Erreichbarkeit des Tumorgewebes, indem das gut zu erreichende Normalgewebe zum primären gentherapeutischen Ziel erklärt wird. Das Verfahren zeichnet sich dadurch aus, daß das normale Organgewebe direkt am Ort einer potentiellen oder stattgehabten Metastasierung mit Abwehrfunktionen ausgestattet wird, die eine Etablierung bzw. ein weiteres Wachstum der Metastasen verhindern. Ebenso kann die weitere Ausbreitung eines inoperablen Primärtumors verhindert werden. Diese Strategie der Imprägnierung des gesunden Gewebes unterscheidet sich grundlegend von allen bisher durchgeführten gentherapeutischen und nicht-gentherapeutischen Ansätzen. Gegenüber der systemischen oder intraperitonealen Applikation z.B. synthetischer Proteaseinhibitoren (Nelson, N.J. (1998) Inhibitors of Angiogenesis enter phase III testing, J Natl. Cancer Inst., 90, 960-963) besteht der Vorteil des gentherapeutischen Ansatzes darin, lokal im Zielorgan sehr hohe Konzentrationen an Wirkstoff zu erreichen mit dem Vorteil der Verringerung von Nebenwirkungen und der Möglichkeit der gleichzeitigen Applikation mehrerer Inhibitoren (s.u.). Außerdem ist eine dauerhafte Genexpression nach einmaliger Vektorapplikation kostengünstiger und nebenwirkungsärmer als die wiederholte Gabe synthetischer Substanzen über einen längeren Zeitraum.

In folgende klinischen Szenarien läßt sich der oben beschriebene Ansatz einfügen:

3

1. Die präoperative oder intraoperative Vektorapplikation in Zielorgane, um die Extravasion etwaiger bei Operation des Primärtumors losgelöster metastatischer Tumorzellen zu unterbinden.
2. Die adjuvante über Jahre dauernde kontinuierliche Expression von Inhibitoren im Zielgewebe zur Verhinderung des Auswachsens bzw. zum Abtöten okkuler Mikrometastasen vor allem bei Hochrisikogruppen wie dem operierten Mammakarzinom mit Lymphknotenbefall.
3. Die Begrenzung des Wachstums bereits etablierter Metastasen oder inoperabler Primärtumoren.

Ausführungsbeispiel 1: Gentherapie kolorektaler Lebermetastasen durch adenoviralen Transfer von Metalloproteinaseinhibitoren (TIMPs) in das Leberparenchym

Metastasen kolorektaler Karzinome produzieren verschiedene Proteasen, die sie zur Intravasion und Extravasion sowie zur Invasion im Zielgewebe benötigen. Darunter sind verschiedene Metalloproteinasen (MMPs) und hier insbesondere die MMP-2 und MMP-9, die für die Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) verantwortlich sind (Duffy, M.J. and McCarthy, K. (1998) Matrix metalloproteinases in cancer: Prognostic markers and targets for therapy (review), Int. J. Oncol., 12, 1343-48). Von den MMPs-2 und -9 wird vorzugsweise Kollagen IV als Hauptkomponente der Basalmembranen abgebaut. Im Zuge dieser Erkenntnisse wurden synthetische Proteaseinhibitoren entwickelt, die klinisch bereits eingesetzt werden und in einigen Fällen bereits die Phase III der klinischen Testung erreicht haben (Nelson, N.J. (1998) Inhibitors of Angiogenesis enter phase III testing, J Natl. Cancer Inst., 90, 960-963).

Die gemäß der Erfindung entwickelte therapeutische Grundidee besteht darin, Hemmstoffe von Metalloproteinasen durch das Leberparenchym sezernieren zu lassen, um metastatische Tumorzellen an ihrer Extravasion zu hemmen, die weitere Infiltration bereits etablierter Metastasen zu unterbinden und die Versorgung der Tumors mit Gefäßen durch Hemmung von Gefäßentwicklung zu unterbinden. Zunächst wurde der Gewebsinhibitor der Metalloproteinase 2 (TIMP-2) ausgewählt.

Dieser Inhibitor, wie auch mehrere verwandte Stoffe, sorgt physiologischerweise für eine Begrenzung der MMP-Aktivität bei Umbauprozessen. Durch Bindung an MMP-2 kann TIMP-2 deren Aktivität hemmen.

Als Vektor zum Gentransfer wurden Erstgenerations-Adenoviren, die zu den etabliertesten Gentransfersystemen gehören (Brand, K. und Strauss, M (1998) Molekulare Grundlagen des Gentransfers und Anwendung für die Gentherapie. In: Ruckpaul,D. und Ganten, D. (Hrsg.) Handbuch der Molekularen Medizin, Bd 2 Tumorerkrankungen, Springer, Berlin, Heidelberg, New York) verwendet. Diese Vektoren, die aufgrund des Fehlens des adenoviralen E1-Gens nicht replizieren können, infizieren mit hoher Effizienz epitheliale Zellen und können in den notwendigen großen Mengen generiert werden.

a) Zum Nachweis der Sekretion von TIMP-2 durch Hepatozyten in vitro, wurden A2 Zellen (Hepatozytenzelllinie aus p53 k.o Mäusen) mit unterschiedlichen multiplicities of infection (MOIs) Ad-TIMP-2 infiziert. Die Konstruktion von Ad-TIMP-2 ist beschrieben worden (Baker, A.H., Wilkinson, G.W., Hembry, R.M., Murphy, G., and Newby, A.C. (1996) Development of recombinant adenoviruses that drive high level expression of the human metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 genes: characterization of their infection into rabbit smooth muscle cells and human MCF-7 adenocarcinoma cells. Matrix Biol. 15: 383-395). Das Virus beinhaltet die humane TIMP-2 cDNA unter der Kontrolle des CMV Promotors. 24h oder 48h später wurde der Zellkulturüberstand (ZKÜ) gewonnen. 10 µl wurden auf ein 10% Polyacrylamidgel aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Für den immunologischen Nachweis wurde ein monoklonaler Antikörper (T2-101, Ab-1 vonDianova, Hamburg, Deutschland) verwendet.

Der Western Blot zeigte eine starke TIMP-2 Bande im Überstand von Ad-TIMP-2 infizierten Zellen und keine Banden in nicht infizierten und Kontrollvirus-infizierten Überständen.

b) Die Funktionsfähigkeit von TIMP-2 wurde mittels reverser Zymographie (nach Baker, A.H., Wilkinson, G.W., Hembry, R.M., Murphy, G., and Newby, A.C. (1996) Development of recombinant adenoviruses that drive high level expression of the human metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 genes:

characterization of their infection into rabbit smooth muscle cells and human MCF-7 adenocarcinoma cells. Matrix Biol. 15: 383-395) überprüft. Zellen wurden infiziert, wie unter (a) beschrieben. Der ZKÜ wurde mittels eines Amicon Konzentrators (Lexington, MA, USA) konzentriert. NaN_3 , Brij and CaCl_2 wurden zugegeben um eine Endkonzentration von of 0.1%, 0.05% bzw. 5 mM zu erhalten. Die Proben wurden mit nicht reduzierendem Puffer gemischt und auf ein 10% Polyacrylamid/SDS Gel geladen, welches 1 mg/ml Gelatine (porcine skin type I, bloom 300, SIGMA G2500) und 107 ng/ml aktives MMP-2 Protein (Oncogene, Cambridge, MA, USA) enthält. Nach der Elektrophorese, wurde das SDS durch Inkubation für 2 h in 2.5 % Triton X 100 aus dem Gel entfernt . Das Gel wurde über Nacht in 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , 0.05% Brij-35, und 0.02% NaN_3 bei 37°C inkubiert. Das Gel wurde mit 0.5% Coomassie Brilliantblau (SIGMA R250, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt, und Banden Gelatinase-nhibitorischer Aktivität, die TIMP-2 representieren erscheinen dann dunkel gegen den verdauten Hintergrund. Die reverse Zymographie zeigte Gelatinase-inhibitorische Aktivität nur in den Überständen Ad-TIMP-2 infizierter Zellen und nicht in Überständen von nicht infizierten oder Kontrollvirus infizierten Zellen.

- c) Die Produktion von MMP-2 durch Tumorzellen wurde durch Gelatin Zymographie nachgewiesen. Der ZKÜ verschiedener Zelllinien wurde gesammelt und konditioniert, wie unter (b) beschrieben. Die Zymographie wurde durchgeführt wie unter (b) beschrieben, nur MMP-2 wurde nicht zugeben. Banden der Lyse, die gelatinolytische Aktivität anzeigen, waren gegen den dunklen Hintergrund sichtbar. Unter mehreren Zelllinien zeigten LS 174 Kolontumorzellen die stärkste MMP-2 Aktivität.
- d) Zum Nachweis rekombinanter humanen TIMP-2 im Blut von Nacktmäusen wurden verschiedene Dosen Ad-TIMP-2 intravenös in die Schwanzvene von Nacktmäusen injiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde Blut abgenommen und Serum gewonnen. Die Proben wurden mittels eines TIMP-2 ELISAs (RPN 2618, Amersham Buchler, Braunschweig, Germany) auf TIMP-2 Gehalt überprüft. Die Ergebnisse zeigen eine Abhängigkeit der TIMP-2 Expression von der applizierten Virusmenge mit einer TIMP-2-Konzentration von 45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei einer Dosis von 3×10^{10} pfus (plaque forming units). Die Serumkonzentration an TIMP-2 war über 2 Wochen

stabil. Diese Ergebnisse zeigen, daß TIMP-2 nach intravenöser Injektion in das Blut sezerniert wird.

e) Um das Ausmaß des Gentransfers in die Leber zu prüfen, wurden Adenoviren in die Schwanzvene von Nacktmäusen injiziert. Nach drei Tagen wurden die Tiere getötet und die Lebern in Flüssigstickstoff eingefroren. Zur immunhistochemischen Detektion von TIMP-2 wurde ein monoklonaler Mausantikörper gegen humanes TIMP-2 (1:10, T2-101, Ab-1, Dianova, Hamburg, Germany) verwendet. Ein FITC konjugierter Schaf anti-Mausantikörper wurde als sekundärer Antikörper verwendet. Das Ergebnis der Färbung ergab eine Expression von TIMP-2 durch 40% der Hepatozyten bei einer Dosis von 3×10^{10} pfu und von >80% bei einer Dosis von 6×10^{10} pfu. Eine ähnliche Gentransfereffizienz wurde nach Applikation von Ad- β gal und nachfolgendes X-gal staining dokumentiert.

f) Die Wirksamkeit intravenöser Applikation von Ad-TIMP-2 gegenüber LS 174 abgeleiteten Lebermetastasen wurde mit folgenden Experimenten geprüft. Adenoviren wurden 1 Tag vor oder 10 Tage nach Metastaseninduktion appliziert. Die Metastaseninduktion erfolgte durch Applikation von 2×10^6 LS174 Zellen in die Milz der Tiere. 5 Wochen nach Metastaseninduktion wurden die Tiere getötet und die Tumorgewichte bestimmt. Im präventiven Versuchsansatz wurden an Tag 0 Ad-TIMP-2 oder Ad- β gal Kontrollvirus in einer Dosis von 3×10^{10} pfu, die zu etwa 40% Leberzellinfektion führt, über die Schwanzvene gegeben. Nach 3 Tagen erfolgte die Metastaseninduktion über die oben beschriebene Milzinjektion von Tumorzellen. Nach 4 Wochen wurde das Experiment beendet und die Volumina der Lebertumoren bestimmt. Es zeigte sich, daß sowohl in der unbehandelten Kontrollgruppe, wie auch in der mit Kontrollvirus behandelten Gruppe die Mehrzahl der Tiere eine, die Leber fast vollständig aufbrauchende, Metastasierung aufwiesen, während die mit Ad-TIMP-2 behandelten Tiere in der Mehrzahl makroskopisch tumorfrei waren (Abbildung 1: Unbehandeltes, Ad- β gal behandeltes (Mitte) und Ad-TIMP-2 behandeltes Tier (rechts)).

Die quantitative Auswertung ergab ein Verhältnis des Mittelwertes der Tumorgewichte in den Versuchsgruppen von 1:20 (Ad-TIMP-2: Ad- β gal oder unbehandelt, Abbildung 2, Punkte entsprechen einzelnen Tieren, Balken entsprechen den Mittelwerten). Die histopathologische Untersuchung erzielte nur

vereinzelte Mikrometastasen in den makroskopisch tumorfreien Tieren der Ad-TIMP-2 Gruppe. Damit läßt sich feststellen, daß die gentherapeutisch medierte Sekretion von TIMP-2 durch Hepatozyten sowohl die Zahl als auch die Größe kolorektaler Metastasen im Nacktmausmodell hochsignifikant einschränkt. Dieser Befund war in seiner Eindeutigkeit überraschend und spricht für eine zentrale, nicht ersetzbare Funktion der MMP-2. Da im beschriebenen Ansatz nur etwa 40% der Hepatozyten transduziert waren liegt hier offensichtlich eine hochwirksame Therapie vor, die vermutlich durch lokale hohe Konzentrationen des Wirkstoffs mit antimetastatischer Wirkung auf mehreren Ebenen (Extravasion, Infiltration und Angiogenese) bedingt ist.

In einem zweiten Versuch erfolgte die Applikation der therapeutischen Vektoren eine Woche nach Metastaseninduktion. In diesem Falle war die Therapieeffizienz geringer als bei präventiver Gabe der Vektoren. Die Unterschiede zwischen Behandlungsgruppe (TIMP-2) und Kontrollgruppen (Ad-ßgal oder unbehandelt) waren aber hochsignifikant.

g) Die Lebern der Tiere beider experimenteller Ansätze wurden histologisch aufgearbeitet, um sie auf die Standard-Tumorparamenter Apoptose und Proliferation sowie das Ausmaß an Angiogenese zu untersuchen.

Zur Bestimmung der Angiogenese, Proliferation und Apoptose wurden Paraffinschritte der Lebern angefertigt und mit den folgenden Antikörpern gefärbt: Zum Nachweis der Angiogenese wurde ein CD31 Antikörper (Daco, Hamburg, Germany) verwendet, zur Bestimmung der Prozentzahl proliferierender Zellen ein MIB-1 (Ki-67) Antikörper (dia 505, Dianova). Der Nachweis erfolgte mittels eines biotinylierten zweiten Antikörpers und eines horse-radish-konjugiertem Avidin (Dako). Zum Nachweis von Apoptose wurde ein ApopTag fluorescein in situ apoptosis Kit (Intergen, Oxford, UK, TUNEL-Methode) verwendet. Deparaffinierte Schnitte wurden mit Proteinase K vorbehandelt. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) wurde zur primären Färbung verwendet und anti-Digoxigenin, konjugiert an Fluorescein, wurde als Reporter Molekül verwendet. Propidiumiodid wurde als Gegenfärbung eingesetzt. Mitosen wurden auf Hematoxylin/Eosin gefärbten Schnitten gezählt. 10 mikroskopische Felder pro Tier wurden bei einer Vergrößerung von x400 (MIB, mitoses, CD31) oder mit einem Ölimmersionsobjektiv (x1000, TUNEL) unter Verwendung eines Zeiss (Axioskop) Fluoreszenzmikroskops (Carl Zeiss, Jena,

Germany) gezählt, und die Mittelwerte wurden errechnet. Die Mittelwerte aller Daten tumortragender Tiere in den einzelnen Behandlungsgruppen wurden errechnet, und zur statistischen Analyse wurde Student's T-Test angewendet.

Es zeigte sich eine signifikant bis hochsignifikant erniedrigte Proliferationsrate und Anzahl an Blutgefäßen und erhöhte Apoptoserate bei Ad-TIMP-2 behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten oder Kontrollvirus behandelten Tieren.

Weitere Ausführungsformen der Erfindung betreffen Vektoren, Promotoren/Enhancer, Transgene, Transmembrananker und Zielorgane

Vektoren

Vor allem beim Vorliegen okkuler Metastasen, deren Reaktivierung erst nach jahrelanger Latenz auftreten kann und bei präoperativer Metastasenprävention ist die Langzeitexpression des transferierten Gens essentiell. Bei Verwendung von Erstgenerations-Adenoviren sind die therapeutischen Effekte zeitlich auf einige Wochen begrenzt. Hierfür werden immunologische Abwehrreaktionen des Empfängers verantwortlich gemacht. Diese scheinen durch die Restexpression adenoviraler Gene bedingt zu sein (Yang, Y. et al. (1994) Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenovirus for gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4407-4411.). Ein vielversprechender Ansatz zur Reduktion der Immunogenität ist die Auslagerung aller kodierenden adenoviralen Genomabschnitte aus dem therapeutischen Vektor (Chen, H.H. et al. (1997) Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1645-1650). Gleichzeitig wird die Transportkapazität solcher Viren erheblich erhöht, so daß mehrere Transgene auf einem Vektor Platz haben, was einen Angriff an verschiedenen Stellen der Metastasierungskaskade möglich macht. Solche TIMP-2 tragenden, sogenannten helper dependent (HD), gutless, oder Minimal-Adenoviren können vermutlich einen langandauernden Schutz vor Organmetastasierung bieten. Weitere Vektoren, die eine länger dauernde Fremdgenexpression zulassen, sind Retroviren und adeno-assoziierte Viren (AAVs). Beide Viren sind nicht immunogen und integrieren notwendigerweise (Retroviren) oder potentiell (AAVs) in das Genom der Wirtszelle. Während bei Retroviren die Notwendigkeit der Replikation der Zielzellen und die Schwierigkeit der Generation hochtitriger Virussuspensionen noch

Probleme bereiten, könnten moderne AAV-Vektoren bereits mittelfristig zum Gentransfer von Proteaseinhibitoren verwendet werden. Aussichtsreiche Vektoren sind außerdem Lentiviren Hybridkonstrukte sowie Herpes Simplex Viren, die eine hohe Affinität zu neuronalem Gewebe haben und daher insbesondere zur Behandlung von Hirnmetastasen und Glioblastomen geeignet sind.

Unter den nicht viralen Vektorsystemen sind Liposomen hervorzuheben.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist die Modifikationen in der Oberflächenstruktur von Viren, die ein Retargeting der Vektoren ermöglicht. Dies wird erreicht in dem ein geeigneter Ligand wird auf viralen spikes exprimiert wird, was eine gezielte Transduktion bestimmter Normalgewebe ermöglicht. So kann man z.B. durch Inkorporation einer Heparindomäne Heparan-exprimierende Zellen gezielt adenoviral transduzieren.

Enhancer/Promotoren

Es können Enhancer/Promotoren verwendet werden, die im jeweiligen zu schützenden Normalgewebe aktiv sind. Hierunter fällt in den meisten Fällen das Organparenchym. In Einzelfällen kann auch eine Expression von Antitumortransgenen durch unterrepräsentierte Zellen des Organs sinnvoll sein, wie z.B. die unten angesprochene Sekretion von Kollagen z.B. durch Fibroblasten.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, Promotoren zu verwenden, die erst nach Zugabe einer körperfremden Substanz aktiviert werden. Mit solchen Promotoren, wie z. B. Tetracyclin abhängigen Promotorelementen oder Steroid responsiven Elementen hat man die Möglichkeit, nur sporadisch zu imprägnieren oder die für eine Metastasierung gefährlichsten Zeitpunkte auszuwählen.

Transgene

1. TIMP-2 ist das geeignete Protein zur Behandlung LS174-Zell abgeleiteter Metastasen. MMP-2, welche durch TIMP-2 gehemmt wird, gehört zu den für die Tumorzellinvasion relevantesten Proteasen. Andere Zelllinien produzieren jedoch auch andere MMPs, und dies spiegelt sich auch im Proteasemuster humaner Tumoren wieder. Auch die extrazelluläre Matrix der Zielorgane ist unterschiedlich

aufgebaut was unterschiedliche Anforderungen an die Tumorzellproteasen stellt. Ein allgemeingültiger Ansatz muß daher auch andere Proteasehemmstoffe als TIMP-2, wie z.B. TIMP-1, PAI-1 oder PAI-2 einbeziehen. Modifikationen in der Struktur der natürlich vorkommenden Inhibitoren führen zu Steigerungen der Wirksamkeit oder zur Verringerung etwaiger Nebenwirkungen. Solche Modifikationen bestehen in Verkürzungen des Moleküls oder in der Veränderung der Sequenz durch Austausch einzelner Basen der DNA. Beispielweise gelingt es durch Entfernung eines endständigen (C-terminalen) Teils des TIMP-2 Moleküls, dessen unerwünschte Protease-aktivierende Funktion zu entfernen.

2. Eine Alternative zur Hemmung der Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) ist die Verstärkung oder Modifikation derselben. Es können hier natürlicherweise vorkommende Komponenten der extrazellulären Matrix überexprimiert werden. Hierunter fallen die Gene für die verschiedenen Kollagene, Fibronectin, Laminin und Gene deren Produkte für die Synthese von nicht proteinischen Komponenten der ECM verantwortlich sind. Weiterhin können Komponenten der ECM, die gewöhnlich nicht in dem betreffenden Organ exprimiert werden, ortsfremd exprimiert werden und damit die Organspezifität von Metastasen verändert werden. Weiterhin können nicht abbaubare oder schwer abbaubare Substanzen, die ein unüberwindliches Hindernis für metastatische Zellen darstellen exprimiert werden.

Ausführungsbeispiel 2:

Es ist seit längerem bekannt, daß in zirrhotischen Lebern seltener Metastasen entstehen, als in normalen Lebern. Ursache hierfür ist vermutlich die Hemmung der Ausbreitung metastatischer Zellen in fibrotischem Gewebe. Diesen Zusammenhang kann man therapeutisch nutzen und erweitern indem hepatisches Normalgewebe durch Gentransfer dazu gebracht wird, seine Mikroanatomie so zu ändern, daß eine Art eingeschränkte künstliche Zirrhose/Fibrose zu generiert wird und damit metastatische Zellen an ihrer Expansion gehindert werden. Kollagen IV ist Hauptbestandteil von Basalmembranen. Eine solche existiert zwischen Hepatozyten und Sinusoïden nicht. Nur wenig kollagenes Gewebe liegt im Disse'schen Raum. Eine geringgradige Erhöhung des Kollagengehaltes wird die Metastasierfähigkeit empfindlich einschränken.

Vektorkonstruktion: Die beiden Polypeptidketten, die die Tripelhelix der Kollagenfibrille generieren, werden in einen Minimal-Adenovirus shuttle Vektor kloniert. Als Promotor wird ein tet-Aktivator-responsiver und Doxycyclin-abhängiger Promotor verwendet, um das Ausmaß der Transgenexpression steuerbar zu halten. Außerdem wird der tet-Aktivator mit auf das shuttle Plasmid gebracht. Unter Verwendung eines beliebigen Verpackungssystems wird ein Minimal-Adenovirus hergestellt (=HDAD-tetColl)

Vektortestung: In Nacktmäusen werden durch Injektion von LS 174 Zellen Lebermetastasen induziert. Die Verabreichung von HDAd-tetColl erfolgt in Analogie zur Methodik in Ausführungsbeispiel 1. Gleches gilt für die Auswertung.

3. Ein anderer Weg zur Blockade von Tumorzellinvasion und Motilität ist die Verstärkung der Zell-Zell und Zell-Matrix-Adhäsionen. Zu nennen sind die tight junctions mit den Proteinen Claudin und Occludin, die Desmosomen und Adherence junctions mit dem Hauptprotein Cadherin, Integrine, die v.a. mit Komponenten der ECM reagieren, die Immunglobulin Superfamilie, die Selectine und die Muzine.

Ausführungsbeispiel 3:

Es wurde bereits gezeigt, daß E-Cadherin für die Interaktion von Epithelzellen verantwortlich ist und ein Verlust von E-Cadherin durch Zellen im Primärtumor Metastasierung fördert (Birchmeier, W. (1995) E-cadherin as a tumor (invasion) suppressor gene. Bioessays 17, 97-99). Eine Expression von E-Cadherin durch Normalzellen führt einerseits zu einer Adhesion mit den Tumorzellen und zu einer Hemung von deren Motilität und weiterhin zu einer Verstärkung der Adhesion innerhalb der Normalzellen.

Vektorkonstruktion: Ein Erstgenerations-Adenovirus wird konstruiert, welches das E-Cadherin-Gen unter der Kontrolle des RSV-Promotors trägt: Ad-RSV-E-Cad.

In vitro Testung: Zur Funktionstestung werden A2 Zellen mit Ad-RSV-E-Cad transduziert. Eine Zunahme der Adhesion wird durch Bestimmung der Zeitdauer ermittelt, die Trypsin benötigt, um die Zellen zu vereinzeln.

Vektortestung :In Nacktmäusen werden durch Injektion von LS 174 Zellen Lebermetastasen induziert. Die Verabreichung von Ad-RSV-E-Cad erfolgt in Analogie zur Methodik in Ausführungsbeispiel 1. Gleches gilt für die Auswertung.

Transgene mit Membranankersequenz

Suizidgene werden im Sinne der Erfindung zur Imprägnierung von Normalgewebe verwendet, dazu müssen sie mit einer Membranankersequenz ausgestattet werden, um extrazellulär wirksam zu sein und eine applizierte Prodrug auch extrazellulär toxifizieren zu können.

Ausführungsbeispiel 4:

Das Gen für das Suizidgen Cytosin Desaminase unter der Kontrolle des HNFAlbumin-Promotors wird mit einer Membranankersequenz versehen, so daß es nach Transfektion membranständig exprimiert wird. Diese Expressionskassette wird in einen AAV-shuttle Plasmid kloniert und ein AAV wird unter Verwendung eines beliebigen Helfersystems hergestellt (=AAV-HNFAlb-CD-Tm).

In vitro Testung: A2 Zellen werden mit AAV-HNFAlb-CD-Tm transduziert. 24 h nach Transduktion wird die Prodrug 5-FC in den Zellkulturüberstand (ZKÜ) gegeben. 5-FC wird nun durch die membranständige CD in das zytotoxische 5-FU überführt. Der Überstand wird nach 24 h gesammelt und auf die Zelllinie LS174 sowie auf ruhende primäre Hepatozyten gegeben. Nach weiteren 72h werden Zellzählungen vorgenommen, und das Ausmaß der Apoptose wird bestimmt.

In vivo Testung: Vektorapplikation und Ermittlung der Therapieeffizienz verlaufen in Analogie zum Ausführungsbeispiel 1.

Zielorgane

Auf Grund der hervorragenden Infizierbarkeit der Leber bei systemischer Gabe von Adenoviren und der hohen klinischen Relevanz der Behandlung kolorektaler Metastasen wurde das erfindungsgemäße Verfahren an Hand des oben beschriebenen Krankheitsmodells entwickelt. Das Modell lässt sich auch auf andere Tumorerkrankungen anwenden. Zu den häufigsten Krankheitsbildern gehören Leber-, Lungen-, Knochen- und Hirnmetastasen bei Mammakarzinom mit Latenzzeiten bis zu 10 Jahren nach Entfernung des Primärtumors, ein Zeitraum, der bisher ungenutzt verstreicht, Hirnmetastasen bei Bronchialkarzinom und Knochenmetastasen bei Prostatakarzinom.

13

Weiterhin gibt es Primärtumoren, die aufgrund des fortgeschrittenen Stadiums primär inoperabel sind, wie häufig Glioblastome und Hepatozelluläre Karzinome. Als lebensverlängernde Maßnahme ist hier der Schutz des umgebenden Normalgewebes nach oben genanntem Prinzip vorstellbar.

Legende zu den Abbildungen:

Abbildung 1: Verhinderung von Lebermetastasierung durch systemische Applikation von Ad-TIMP-2. An Tag 0 wurden 3×10^{10} pfu Ad-TIMP-2 oder Ad- β gal in die Schwanzvene von Nacktmäusen appliziert. 3 Tage später erhielten die Tiere eine intrasplenale Injektion von LS174 Kolonkarzinomzellen zur Induktion von Lebermetastasen. Representative *in situ* Photographien von unbehandelten (links), Ad- β gal behandelten (Mitte) und Ad-TIMP-2 behandelten (rechts) Tieren nach 5 Wochen.

Abbildung 2: Methodik wie Abbildung 1. Nach 5 Wochen wurden die Tiere getötet und die Tumormassen wurden bestimmt. Punkte entsprechen einzelnen Tieren, Balken entsprechen den Mittelwerten.

Patentansprüche

1. Mittel zur gentherapeutischen Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen umfassend einen
 - Vektor im Sinne eines Gentransfervehikels
 - Enhancer/Promotor
 - Transgenwobei mindestens einer der aufgeführten Bestandteile auf die Imprägnierung von Normalgewebe ausgerichtet ist.
2. Anwendung des Mittels nach Anspruch 1 zur gentherapeutischen Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen umfassend einen
 - Vektor im Sinne eines Gentransfervehikels
 - Enhancer/Promotor
 - Transgenwobei mindestens einer der aufgeführten Bestandteile auf die Imprägnierung von Normalgewebe ausgerichtet ist.
3. Anwendung eines Gentransfervektors umfassend ein Transgen in operativer Verknüpfung mit einem Enhancer/Promotor zur Herstellung eines Mittels für die gentherapeutische Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen durch Verabreichung an Normalgewebe.
4. Verfahren zur gentherapeutischen Prophylaxe und Therapie von Tumorerkrankungen dadurch gekennzeichnet, daß man ein Mittel umfassend einen
 - Vektor im Sinne eines Gentransfervehikels
 - Enhancer/Promotor
 - Transgenwobei mindestens einer der aufgeführten Bestandteile auf die Imprägnierung von Normalgewebe ausgerichtet ist, einem Subjekt, welches einer prophylaktischen oder therapeutischen Tumorbehandlung bedarf, derart verabreicht, daß der Vektor im Wesentlichen von Normalzellen aufgenommen wird.

5. Mittel nach Anspruch 1, mit einem Promotor und/oder Enhancer, der durch Transkriptionsfaktoren reguliert wird, die in Normalgewebe aktiv sind.

6. Mittel nach Anspruch 5 enthaltend

den CMV-Promotor oder den SV 40 Promotor oder den RSV Promotor, oder leberspezifische Promotoren, wie den Albumin Promotor oder lungenspezifische Promotoren oder hirngewebsspezifische Promotoren oder knochenspezifische Promotoren oder Promotoren, die in potentiellen metastatischen Zielorganen oder Organen des Entstehens von Primärtumoren aktiv sind.

7. Mittel nach Anspruch 5 enthaltend

einen Enhancer/Promotor der durch Zugabe einer applizierbaren Substanz aktiviert wird.

8. Mittel nach Anspruch 5 und 7 bei dem es sich um einen Tetracyclin abhängigen oder einen Steroidhormon abhängigen Promotor handelt.

9. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend Transgene für Substanzen,

- welche das Wachstum des Tumors begrenzen
- den Tumor zerstören
- das Normalgewebe vor Tumorinvasion schützen.

10. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend Gene von Metalloproteaseinhibitoren

11. Mittel nach Anspruch 1 und 10 enthaltend ein antitumorales Transgen kodierend für:

TIMP-1 oder TIMP-2

12. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Protease-inhibitorisches Transgen kodierend für:

TIMP-3 oder TIMP-4 oder PAI-1 oder PAI-2.

13. Mittel nach Anspruch 11 oder 12 enthaltend ein modifiziertes Transgen, dessen antitumorale Wirkung durch diese Modifikation verstärkt wurde.

14. Mittel nach Anspruch 13 welches als betreffendes Transgen C-terminal trunkierte TIMP-2 enthält.
15. Mittel nach Anspruch 1, 2 oder 3 enthaltend ein Transgen der Extrazellulären Matrix.
16. Mittel nach Anspruch 15 enthaltend mindestens zwei Polypeptidketten des Kollagen oder Fibronectin oder Laminin oder Gene deren Produkte für die Synthese von nicht proteinischen Komponenten der ECM verantwortlich sind.
17. Mittel nach Anspruch 15 oder 16 enthaltend ein so modifiziertes Transgen der Extrazellulären Matrix, daß es schwer oder nicht abbaubar ist.
18. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Transgen kodierend für ein Adhäsionsmolekül.
19. Mittel nach Anspruch 18 in dem das betreffende Adhäsionsmolekül das Claudin oder Occludin oder ein Cadherin oder ein Integrin oder ein Gen aus der Immunglobulin Superfamilie ein Selectin oder ein Muzin ist.
20. Mittel zur Prophylaxe und Behandlung von Tumorerkrankungen enthaltend ein antitumorales Transgen oder Sequenzen desselben, welches mit einer Membranankersequenz versehen ist.
21. Anwendung eines Gentransfervektors zur Herstellung eines Mittels zur Prophylaxe und Behandlung von Tumorerkrankungen enthaltend ein antitumorales Transgen oder Sequenzen desselben, welches mit einer Membranankersequenz versehen ist.
22. Verfahren zur Prophylaxe und Behandlung von Tumorerkrankungen bei dem ein antitumorales Transgen oder Sequenzen desselben, welches mit einer Membranankersequenz versehen ist transferiert wird.

23. Mittel nach Anspruch 20 welches als betreffendes Transgen ein Suizidgen oder ein sonstwie chemotherapeutisch wirksames Gen enthält
24. Mittel nach Anspruch 23 in dem das betreffende Transgen Cytosin Desaminase oder aktive Teilsequenzen derselben oder Nitroreduktase oder aktive Teilsequenzen derselben sind.
25. Mittel nach Anspruch 1 in dem der Vektor ein Virus ist.
26. Mittel nach Anspruch 25 in dem das Virus ein Erstgenerations-Adenovirus oder ein Adeno-assoziiertes Virus oder ein Minimal-Adenovirus oder ein HSV oder ein Lentivirus ist.
27. Mittel nach Anspruch 26 in dem das Virus ein Lentivirus/Minimal-Adenovirus Hybrid ist.
28. Mittel nach Anspruch 27 in dem der Vektor ein nicht-humaner Mammalier-Adenovirus ist.
29. Mittel nach Anspruch 1 in dem der Vektor kein Virus ist.
30. Mittel nach Anspruch 29 in dem der Vektor eine liposomale Formulation ist oder Trägerproteine verwendet sind.
31. Mittel nach Anspruch 25 und 29, in dem die Oberfläche so modifiziert ist, daß ein spezifischer Gentransfer in das Normalgewebe erreicht wird.
32. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Minimal-Adenovirus und TIMP-2.
33. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Minimal-Adenovirus und C-terminal trunkiertes TIMP-2.
34. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein AAV und TIMP-2

35. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Erstgenerations-Adenovirus und TIMP-2.
36. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Lentivirus/Minimaladenovirus Hybrid und TIMP-2.
37. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein AAV und C-terminal trunkiertes TIMP-2.
38. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Minimal-Adenovirus und E-Cadherin.
39. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein AAV und E-Cadherin.
40. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend ein Minimal-Adenovirus und mindestens zwei Polypeptidketten des Kollagen.
41. Mittel nach Anspruch 1 zum Gentransfer ins Lebergewebe.
42. Mittel nach Anspruch 1 zur Therapie und Prophylaxe von Lebermetastasen.
43. Mittel nach Anspruch 1 zur Therapie von Hirntumoren.
44. Mittel nach Anspruch 1 zur Therapie von Lungenmetastasen.
45. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend den HNFAlbumin-Enhancer/Promotor, AAV und TIMP-1.
46. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend einen Enhancer/Promotor, der durch eine körperfremde Substanz aktiviert wird und mindestens zwei Polypeptidketten des Kollagen.
47. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend einen leberspezifischen Promotor, ein AAV und einen Metalloprotease-Inhibitor.
48. Mittel nach Anspruch 1 enthaltend einen leberspezifischen Promotor, ein Minimal-Adenovirus und einen Metalloprotease-Inhibitor.

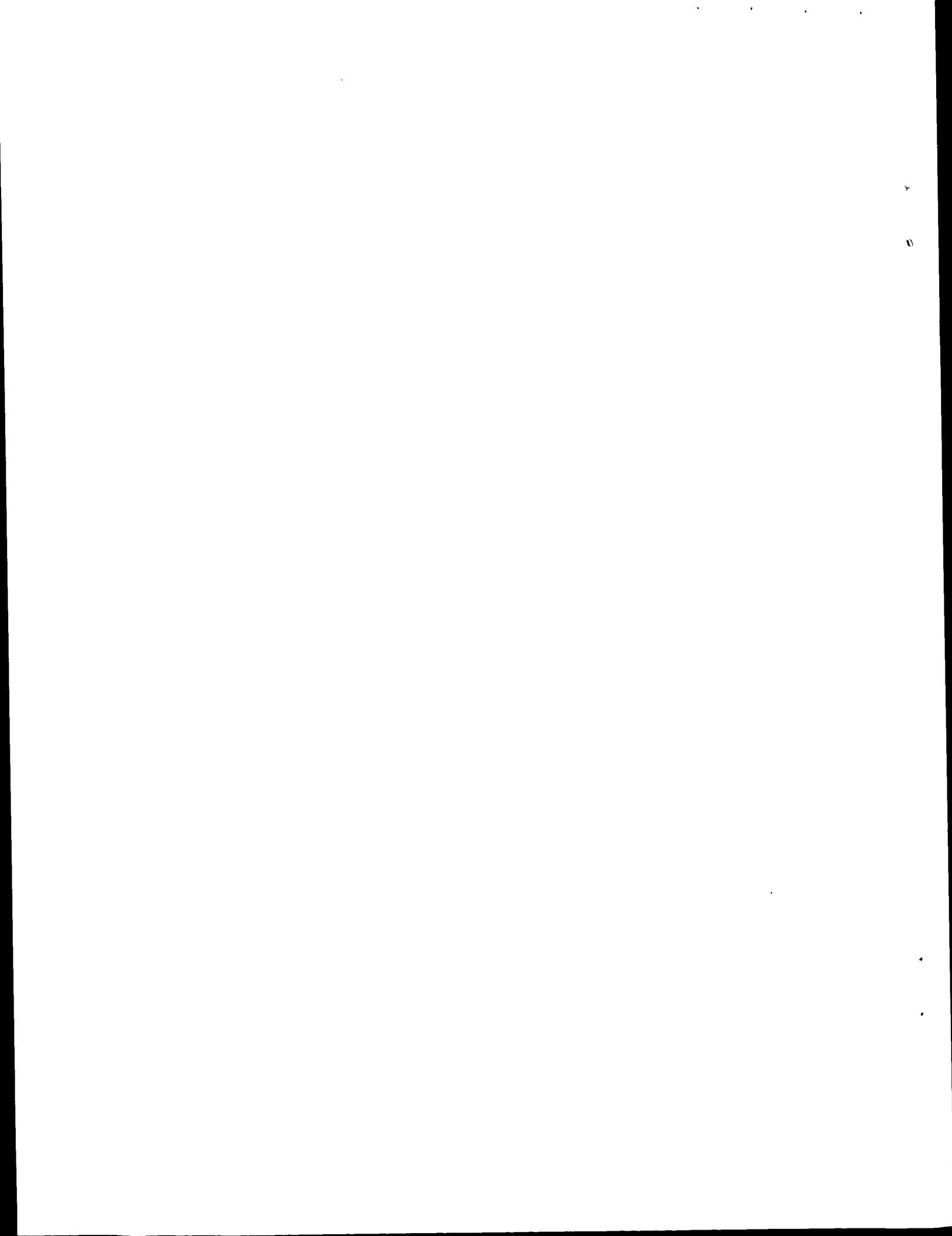
49. Mittel nach Anspruch 1 und 9 enthaltend einen leberspezifischen Promotor und ein Minimal-Adenovirus.

50. Mittel nach Anspruch 1 und 9 enthaltend einen leberspezifischen Promotor und ein AAV.

51. Mittel nach Anspruch 1 und 9 enthaltend einen leberspezifischen Promotor und ein Lentivirus/Minimal-Adenovirus Hybrid.



Abb. 1



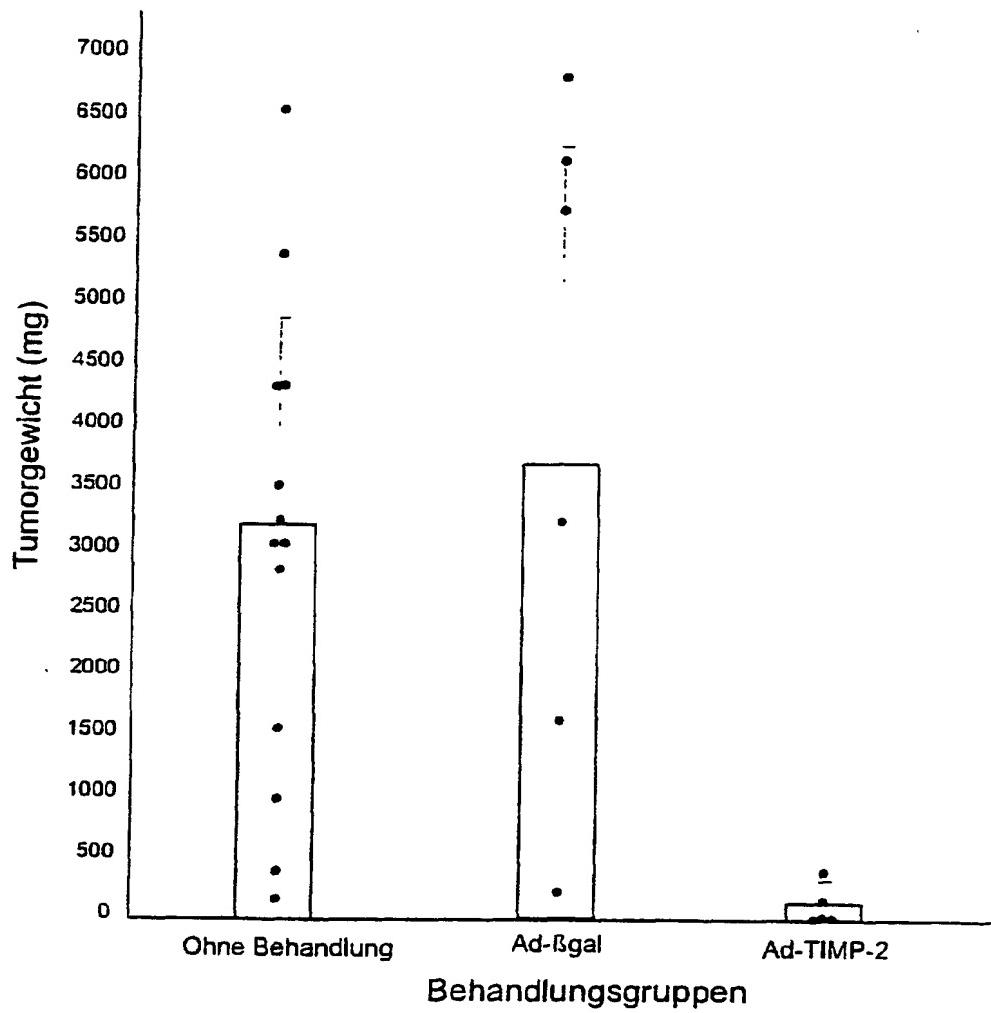
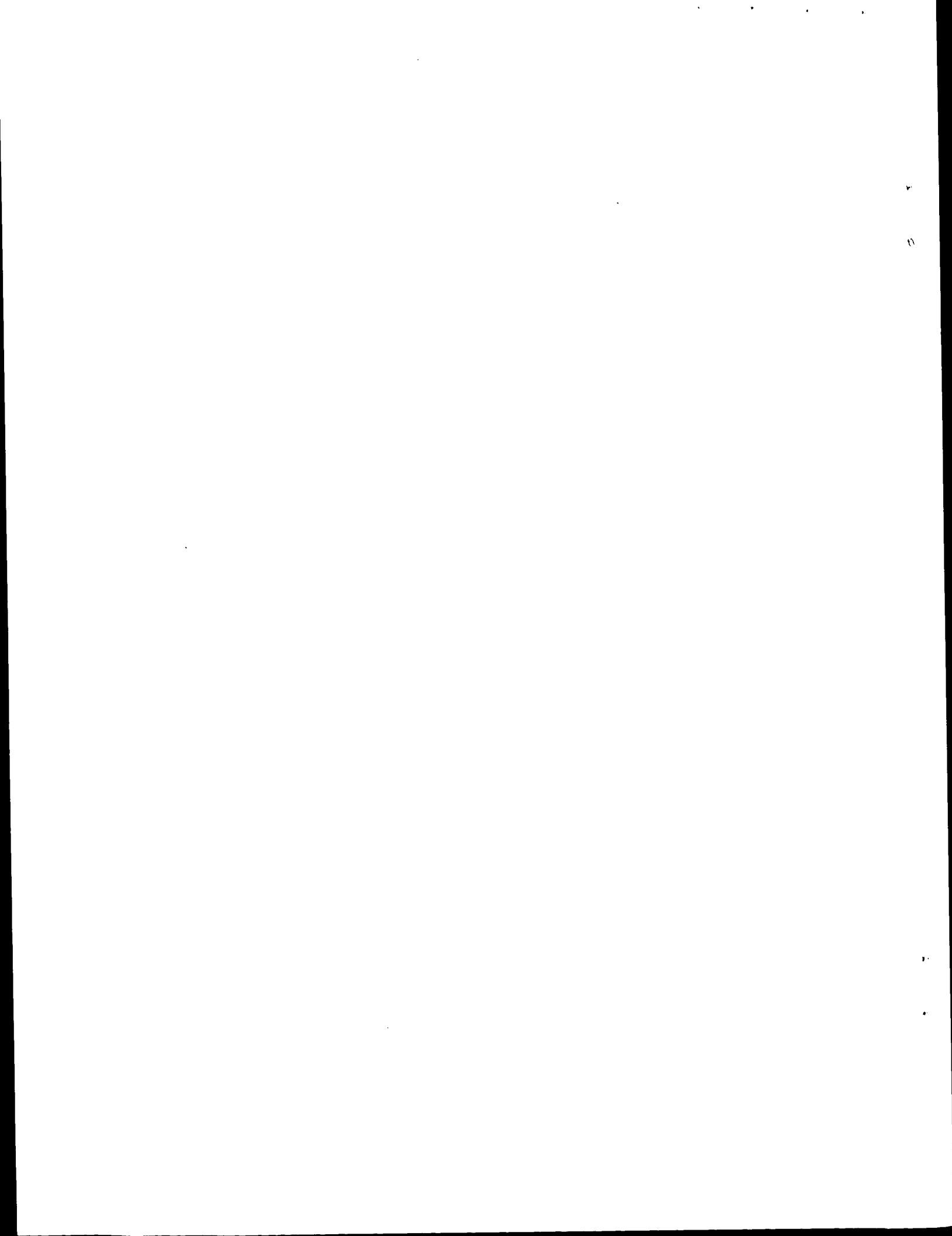


Abb. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 00/01416

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K48/00 A61P35/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | MARAIS R. ET AL: "A cell surface tethered enzyme improves efficiency in gene-directed enzyme prodrug therapy" NATURE BIOTECHNOLOGY, (1997), 15/13 (1373-1377), 32 REFERENCE(S) CODEN: NABIFO ISSN: 1087-0156, XP002151679 C.J. Springer, CRC Centre for Cancer Therapeutics, Institute of Cancer Research, Cotswold Rd., Sutton, Surrey SM2 5NG, United Kingdom. E-mail: caroline@icr.ac.uk the whole document --- | 1-9, 20-24 |
| X | WO 96 03515 A (SPRINGER CAROLINE JOY ;MARAIS RICHARD (GB); CANCER RES CAMPAIGN TE) 8 February 1996 (1996-02-08) the whole document --- | 1-9, 20-24 -/- |

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

| | |
|--|--|
| Date of the actual completion of the International search | Date of mailing of the International search report |
| 9 November 2000 | 28/11/2000 |
| Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Niemann, F |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 00/01416

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|--|-----------------------------|
| X | BOEDEKER B ET AL: "Design of transmembrane suicide fusion genes for genetic manipulation of T-cells." BLOOD, vol. 86, no. 10 SUPPL. 1, 1995, page 995A XP000953303 37th Annual Meeting of the American Society of Hematology; Seattle, Washington, USA; December 1-5, 1995 ISSN: 0006-4971 the whole document --- | 1-9, 20-24 |
| X | BLEZINGER P ET AL: "Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene." NATURE BIOTECHNOLOGY, (1999 APR) 17 (4) 343-8. XP002151680 the whole document --- | 1-9, 29, 30, 41-44 |
| X | DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 10 February 1999 (1999-02-10) SCHULTZ JAN ET AL: "Long-lasting anti-metastatic efficiency of interleukin 12-encoding plasmid DNA." Database accession no. PREV199900145697 XP002151681 abstract & HUMAN GENE THERAPY, vol. 10, no. 3, 10 February 1999 (1999-02-10), pages 407-417, ISSN: 1043-0342 --- | 1-9, 29, 30, 41-44 |
| X | LI H ET AL: "Adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice." GENE THERAPY, vol. 5, no. 8, August 1998 (1998-08), pages 1105-1113, XP000953414 ISSN: 0969-7128 the whole document --- | 1-9, 25-28, 31, 41-44 |
| X | HUANG Y W ET AL: "Adhesion molecules as targets for cancer therapy." HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, (1997 APR) 12 (2) 467-77. REF: 119 , XP000953300 the whole document --- | 1-9, 18, 19, 38, 39 |

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/DE 00/01416

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|------------------------------|
| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | KAWAMATA H. ET AL: "Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1995) 63/5 (680-687). , XP000953304 the whole document --- | 1-14, 32-37, 45, 47-51 |
| X | US 5 731 192 A (REEDERS STEPHEN T ET AL) 24 March 1998 (1998-03-24) the whole document --- | 1, 15-17, 40, 46 |
| A | AHMAD A ET AL: "Mechanisms of metastasis." CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY-HEMATOLOGY, vol. 26, no. 3, December 1997 (1997-12), pages 163-173, XP000953342 ISSN: 1040-8428 the whole document --- | 10-19, 32-48 |
| A | GOSSEN M ET AL: "TIGHT CONTROL OF GENE EXPRESSION IN MAMMALIAN CELLS BY TETRACYCLINE-RESPONSIVE PROMOTERS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, vol. 89, no. 12, 15 June 1992 (1992-06-15), pages 5547-5551, XP000564458 ISSN: 0027-8424 the whole document --- | 7, 8 |
| A | XIAO W ET AL: "Adeno - associated virus as a vector for liver-directed gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, US, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, vol. 72, no. 12, December 1998 (1998-12), pages 10222-10226, XP002125023 ISSN: 0022-538X the whole document --- | 47-51 |
| A | WO 97 04117 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;SANDIG VOLKER (DE); LOESER PETER (DE); ST) 6 February 1997 (1997-02-06) the whole document --- | 47-51 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 00/01416

| Patent document cited in search report | | Publication date | Patent family member(s) | | Publication date |
|--|---|------------------|-------------------------|------------|------------------|
| WO 9603515 | A | 08-02-1996 | AT | 188256 T | 15-01-2000 |
| | | | AU | 693584 B | 02-07-1998 |
| | | | AU | 3119095 A | 22-02-1996 |
| | | | AU | 712383 B | 04-11-1999 |
| | | | AU | 3119195 A | 22-02-1996 |
| | | | CA | 2196051 A | 08-02-1996 |
| | | | CA | 2196052 A | 08-02-1996 |
| | | | DE | 69514234 D | 03-02-2000 |
| | | | DE | 69514234 T | 13-07-2000 |
| | | | DK | 774005 T | 22-05-2000 |
| | | | EP | 0774005 A | 21-05-1997 |
| | | | EP | 0772455 A | 14-05-1997 |
| | | | EP | 0919622 A | 02-06-1999 |
| | | | ES | 2143641 T | 16-05-2000 |
| | | | WO | 9603151 A | 08-02-1996 |
| | | | GR | 3032744 T | 30-06-2000 |
| | | | JP | 10503646 T | 07-04-1998 |
| | | | JP | 10505335 T | 26-05-1998 |
| | | | NZ | 290448 A | 26-01-1998 |
| | | | NZ | 290449 A | 26-08-1998 |
| | | | PT | 774005 T | 30-06-2000 |
| | | | US | 6004550 A | 21-12-1999 |
| | | | US | 6025340 A | 15-02-2000 |
| | | | ZA | 9506263 A | 22-05-1996 |
| | | | ZA | 9506264 A | 15-03-1996 |
| US 5731192 | A | 24-03-1998 | NONE | | |
| WO 9704117 | A | 06-02-1997 | DE | 19525900 C | 12-12-1996 |
| | | | AT | 189481 T | 15-02-2000 |
| | | | CA | 2226926 A | 06-02-1997 |
| | | | DE | 59604375 D | 09-03-2000 |
| | | | EP | 0839205 A | 06-05-1998 |
| | | | ES | 2146404 T | 01-08-2000 |
| | | | JP | 11509412 T | 24-08-1999 |
| | | | US | 6025195 A | 15-02-2000 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 00/01416

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K48/00 A61P35/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENDE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|--------------------|
| X | MARAIS R. ET AL: "A cell surface tethered enzyme improves efficiency in gene-directed enzyme prodrug therapy" NATURE BIOTECHNOLOGY, (1997), 15/13 (1373-1377), 32 REFERENCE(S) CODEN: NABIFO ISSN: 1087-0156, XP002151679 C.J. Springer, CRC Centre for Cancer Therapeutics, Institute of Cancer Research, Cotswold Rd., Sutton, Surrey SM2 5NG, United Kingdom. E-mail: caroline@icr.ac.uk das ganze Dokument --- | 1-9, 20-24 |
| X | WO 96 03515 A (SPRINGER CAROLINE JOY ;MARAIS RICHARD (GB); CANCER RES CAMPAIGN TE) 8. Februar 1996 (1996-02-08) das ganze Dokument --- | 1-9, 20-24 |

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
 - *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

| | |
|---|---|
| Datum des Abschlusses der internationalen Recherche | Absendedatum des internationalen Recherchenberichts |
| 9. November 2000 | 28/11/2000 |
| Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Bevollmächtigter Bediensteter Niemann, F |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

| |
|---|
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE 00/01416 |
|---|

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|-----------------------------|
| X | BOEDEKER B ET AL: "Design of transmembrane suicide fusion genes for genetic manipulation of T-cells." BLOOD, Bd. 86, Nr. 10 SUPPL. 1, 1995, Seite 995A XP000953303 37th Annual Meeting of the American Society of Hematology; Seattle, Washington, USA; December 1-5, 1995 ISSN: 0006-4971 das ganze Dokument --- | 1-9, 20-24 |
| X | BLEZINGER P ET AL: "Systemic inhibition of tumor growth and tumor metastases by intramuscular administration of the endostatin gene." NATURE BIOTECHNOLOGY, (1999 APR) 17 (4) 343-8. XP002151680 das ganze Dokument --- | 1-9, 29, 30, 41-44 |
| X | DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 10. Februar 1999 (1999-02-10) SCHULTZ JAN ET AL: "Long-lasting anti-metastatic efficiency of interleukin 12-encoding plasmid DNA." Database accession no. PREV199900145697 XP002151681 Zusammenfassung & HUMAN GENE THERAPY, Bd. 10, Nr. 3, 10. Februar 1999 (1999-02-10), Seiten 407-417, ISSN: 1043-0342 --- | 1-9, 29, 30, 41-44 |
| X | LI H ET AL: "Adenovirus-mediated delivery of a uPA/uPAR antagonist suppresses angiogenesis-dependent tumor growth and dissemination in mice." GENE THERAPY, Bd. 5, Nr. 8, August 1998 (1998-08), Seiten 1105-1113, XP000953414 ISSN: 0969-7128 das ganze Dokument --- | 1-9, 25-28, 31, 41-44 |
| X | HUANG Y W ET AL: "Adhesion molecules as targets for cancer therapy." HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY, (1997 APR) 12 (2) 467-77. REF: 119 , XP000953300 das ganze Dokument --- | 1-9, 18, 19, 38, 39 |
| | | -/- |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE 00/01416

| C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN | | |
|--|--|-----------------------------|
| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
| X | KAWAMATA H. ET AL: "Over-expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP1 and TIMP2) suppresses extravasation of pulmonary metastasis of a rat bladder carcinoma." INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER, (1995) 63/5 (680-687). , XP000953304 das ganze Dokument --- | 1-14, 32-37, 45,47-51 |
| X | US 5 731 192 A (REEDERS STEPHEN T ET AL) 24. März 1998 (1998-03-24) das ganze Dokument --- | 1,15-17, 40,46 |
| A | AHMAD A ET AL: "Mechanisms of metastasis." CRITICAL REVIEWS IN ONCOLOGY-HEMATOLOGY, Bd. 26, Nr. 3, Dezember 1997 (1997-12), Seiten 163-173, XP000953342 ISSN: 1040-8428 das ganze Dokument --- | 10-19, 32-48 |
| A | GOSSEN M ET AL: "TIGHT CONTROL OF GENE EXPRESSION IN MAMMALIAN CELLS BY TETRACYCLINE-RESPONSIVE PROMOTERS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, US, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, Bd. 89, Nr. 12, 15. Juni 1992 (1992-06-15), Seiten 5547-5551, XP000564458 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument --- | 7,8 |
| A | XIAO W ET AL: "Adeno - associated virus as a vector for liver-directed gene therapy" JOURNAL OF VIROLOGY, US, THE AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, Bd. 72, Nr. 12, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 10222-10226, XP002125023 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument --- | 47-51 |
| A | WO 97 04117 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT ;SANDIG VOLKER (DE); LOESER PETER (DE); ST) 6. Februar 1997 (1997-02-06) das ganze Dokument --- | 47-51 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 00/01416

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | | | Datum der Veröffentlichung |
|---|----------------------------|--------------------------------|------------|--|----------------------------|
| WO 9603515 A | 08-02-1996 | AT | 188256 T | | 15-01-2000 |
| | | AU | 693584 B | | 02-07-1998 |
| | | AU | 3119095 A | | 22-02-1996 |
| | | AU | 712383 B | | 04-11-1999 |
| | | AU | 3119195 A | | 22-02-1996 |
| | | CA | 2196051 A | | 08-02-1996 |
| | | CA | 2196052 A | | 08-02-1996 |
| | | DE | 69514234 D | | 03-02-2000 |
| | | DE | 69514234 T | | 13-07-2000 |
| | | DK | 774005 T | | 22-05-2000 |
| | | EP | 0774005 A | | 21-05-1997 |
| | | EP | 0772455 A | | 14-05-1997 |
| | | EP | 0919622 A | | 02-06-1999 |
| | | ES | 2143641 T | | 16-05-2000 |
| | | WO | 9603151 A | | 08-02-1996 |
| | | GR | 3032744 T | | 30-06-2000 |
| | | JP | 10503646 T | | 07-04-1998 |
| | | JP | 10505335 T | | 26-05-1998 |
| | | NZ | 290448 A | | 26-01-1998 |
| | | NZ | 290449 A | | 26-08-1998 |
| | | PT | 774005 T | | 30-06-2000 |
| | | US | 6004550 A | | 21-12-1999 |
| | | US | 6025340 A | | 15-02-2000 |
| | | ZA | 9506263 A | | 22-05-1996 |
| | | ZA | 9506264 A | | 15-03-1996 |
| US 5731192 A | 24-03-1998 | KEINE | | | |
| WO 9704117 A | 06-02-1997 | DE | 19525900 C | | 12-12-1996 |
| | | AT | 189481 T | | 15-02-2000 |
| | | CA | 2226926 A | | 06-02-1997 |
| | | DE | 59604375 D | | 09-03-2000 |
| | | EP | 0839205 A | | 06-05-1998 |
| | | ES | 2146404 T | | 01-08-2000 |
| | | JP | 11509412 T | | 24-08-1999 |
| | | US | 6025195 A | | 15-02-2000 |